

**Entwicklung eines neuartigen Testsystems
für Wasser- und Chemikalienuntersuchungen
mit gentechnisch veränderten Hefezellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Marcel Sascha Schmitt

aus

Hilden

Bonn 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Hella Lichtenberg-Fraté

2. Gutachter: Prof. Dr. Milan Höfer

Tag der Promotion: 01.08.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Für

Rolf Lumme

* 17. November 1924

† 14. Dezember 2004

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- Titel:** Use of *PMA1* as a housekeeping biomarker for assessment of toxicant induced stress in *Saccharomyces cerevisiae*
Autoren: **Marcel Schmitt**, Petra Schwanewilm, Jost Ludwig und Hella Lichtenberg-Fraté
Journal: *Applied Environmental Microbiology* 72(2): 1515–1522
Erscheinungsjahr: 2006
- Titel:** The toxic potential of an industrial effluent determined with the *Saccharomyces cerevisiae* based assay
Autoren: **Marcel Schmitt**, Georg Gellert und Hella Lichtenberg-Fraté
Journal: *Water Research* 39: 3211 –3218
Erscheinungsjahr: 2005
- Titel:** Assessment of cyto- and genotoxic effects of a variety of chemicals using *Saccharomyces cerevisiae*
Autoren: **Marcel Schmitt**, Georg Gellert, Jost Ludwig u. Hella Lichtenberg-Fraté
Journal: *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 33: 56–63
Erscheinungsjahr: 2005
- Titel:** Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing
Autoren: **Marcel Schmitt**, Georg Gellert, Jost Ludwig u. Hella Lichtenberg-Fraté
Journal: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 142–150
Erscheinungsjahr: 2004
- Titel:** Eine auf Hefe basierende Methode zur Detektion von Zyto- und Genotoxizität
Autoren: **Marcel Schmitt**, Georg Gellert, Jost Ludwig u. Hella Lichtenberg-Fraté
Journal: Tagungsbericht 2003 der Deutschen Gesellschaft für Limnologie WeißenseeVerlag Band II: 585-590 (ISBN 3-89998-033-6)
Erscheinungsjahr: 2004
- Titel:** A yeast-based method for the detection of cyto and genotoxicity
Autoren: Hella Lichtenberg-Fraté, **Marcel Schmitt**, Georg Gellert u. Jost Ludwig
Journal: *Toxicology in Vitro* 17: 709–716
Erscheinungsjahr: 2003
- Titel:** CyGene: Eine neue hefebasierte Methode zur Bestimmung des zytotoxischen und genotoxischen Potenzials von Umweltgiften im Wasserbereich
Autoren: **Marcel Schmitt**, Georg Gellert, Bettina Kirberg, Jost Ludwig und Hella Lichtenberg-Fraté
Journal: *Vom Wasser* 99:111-118
Erscheinungsjahr: 2002

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Beurteilung des Gefährdungspotenzials von Chemikalien	3
1.1.1 Ordnungspolitische Rahmenbedingungen	3
1.1.2 Die Biotestbasierte Analytik von Umweltschadstoffen	4
1.2 DNA-Schäden und DNA-Reparatur	6
1.2.1 DNA-Schäden	6
1.2.2 Erkennung von DNA-Schäden	9
1.2.3 DNA-Reparaturmechanismen	10
1.2.4 Der Einfluss von DNA-Schäden auf Zellzyklus und Genexpression	13
1.2.5 Die Funktion von Rad54p	15
1.3 Die Regulation des PMA1-Promotors unter Einfluss exogener Stressfaktoren	16
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefestämme	19
2.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme	19
2.3 Nährmedien	20
2.3.1 Medium für Stamm-, Übernacht- und Vorkulturen (einfach konzentriert)	20
2.3.2 Medium für Vorkulturen bei Testung komplexer Proben (fünffach konzentriert)	20
2.3.3 Medium für Vorkulturen bei Testung akut toxischer Effekte in serumhaltiger Umgebung (einfach konzentriert)	21
2.3.4 Aminosäure <i>Drop-Out</i> - Mischung	22
2.3.5 Supplement-Stocklösungen	22
2.3.6 Stocklösung der Kohlenstoffquelle	22
2.3.7 Nährmedium zur Anzucht von <i>E. coli</i> : <i>LB</i> -Medium	23
2.3.8 Nährmedium zur Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> XL1-Blue Zellen: <i>SOB</i> -Medium	23
2.4 Quantifizierung von Nucleinsäuren	24
2.4.1 Ethidiumbromid-Fluoreszenz	24
2.4.2 Bestimmung der optischen Dichte	24
2.5 Präparation von Nucleinsäuren:	25
2.5.1 Bakterien Plasmid-Mini-Präparation durch alkalische Lyse	25
2.5.2 Hochreine Bakterien Plasmid-Präparation durch Aufreinigung mit Silica-Säulen	26
2.5.3 DNA-Präparation aus Hefen	27
2.6 Transformation von Bakterien und Hefen	29
2.6.1 Transformation von Bakterien	29
2.6.1.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> XL1-Blue Zellen	29
2.6.1.2 Transformation der kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA	30
2.6.2 Transformation von Hefen mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode	30
2.6.2.1 Herstellung und Lagerung von kompetenten Hefezellen	30
2.6.2.2 Transformation der Zellen	31
2.7 Lagerung von Hefen	32
2.7.1 Herstellung von Kryokulturen	32
2.8 Modifikationen von DNA	33

2.8.1	Restriktionsspaltung	33
2.8.2	Glätten kohäsiver Enden von DNA-Fragmenten	34
2.8.3	Dephosphorylierung der 5'-Enden linearer DNA-Fragmente	36
2.8.4	DNA Insert Ligation in Vektor-DNA	37
2.9	Analyse von DNA	39
2.9.1	DNA-Gelelektrophorese	39
2.9.2	Gelelution von DNA-Fragmenten aus Agarose Gelen	40
2.9.3	DNA-Sequenzanalyse	41
2.9.4	Polymerase-Ketten-Reaktion	41
2.10	Datenverarbeitung	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Gentechnisch modifizierter Hefe-Teststamm	49
3.2	Qualitätssicherung	51
3.2.1	Entwicklung eines geeigneten Nährmediums für das hefebasierte Testverfahren	51
3.2.2	Alterung des Nährmediums und die damit verbundene Eigenfluoreszenzabtrift	52
3.2.3	Verwendung von Mikrotestplatten	53
3.3	Wachstumshemmung als Parameter cytotoxischer Effekte	56
3.3.1	Untersuchung verschiedener Monosubstanzen	56
3.3.2	Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Toxizität von Schwermetallen	61
3.3.3	Vergleich verschiedener Expositionszeiten	63
3.4	Nachweise probenassoziierten gentoxischen Potenzials	65
3.4.1	Die Aktivität des RAD54-Promotors als Maß für gentoxische Potenziale	65
3.4.2	Klonierung des Nachweiskonstruktes	65
3.4.3	Funktionelle Charakterisierung	66
3.4.4	Methodische Kriterien zur Berechnung von Induktionsraten	67
3.4.5	Untersuchung verschiedener Monosubstanzen	69
3.4.6	Vergleich verschiedener Expositionszeiten	73
3.4.7	Metabolische Aktivierung durch Leberhomogenisat (S9-Aktivierung)	75
3.5	Die Untersuchung von Abwasserproben	79
3.5.1	Bewertung der Ergebnisse	79
3.6	Die Aktivität des PMA1-Promotors als Maß für metabolische Aktivität	83
3.6.2	Funktionelle Charakterisierung des Indikatorstammes für den Nachweis der metabolischen Aktivität	84
3.6.3	Testung von Monosubstanzen	87
3.6.4	Testung von Monosubstanzen in serumhaltigem Nährmedium	89
4	Diskussion	92
4.1	Verwendung eines sensitiven Hefestammes für den Nachweis cytotoxischer Effekte	92
4.2	Wachstumshemmung zur Beurteilung cytotoxischer Eigenschaften	93
4.2.1	Die Untersuchung verschiedener Monosubstanzen	93
4.2.2	Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Toxizität von Schwermetallen	98
4.2.3	Vergleich verschiedener Expositionszeiten	101
4.2.4	Schlussfolgerungen	103

4.3	Entwicklung eines auf Hefe basierenden Verfahrens zum Nachweis probenassoziierten gentoxischen Potenzials	103
4.3.1	Untersuchung verschiedener Monosubstanzen	104
4.3.2	Vergleich verschiedener Expositionszeiten	109
4.3.3	Metabolische Aktivierung durch Leberhomogenisat (S9-Aktivierung)	109
4.3.4	Schlussfolgerungen	110
4.4	Die Untersuchung von Abwasserproben	111
4.4.1	Mögliche Störungsquellen und Fragen zur Plausibilität	111
4.4.2	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	112
4.4.3	Der Einfluss von Schwebstoffen auf die Toxizität der Abwasserproben	113
4.4.4	Probenalter und Toxizität	114
4.4.5	Schlussfolgerungen	114
4.5	Die Aktivität des PMA1-Promotors als Maß für die metabolische Aktivität	115
4.5.1	Testung von Monosubstanzen	116
4.5.2	Der Einfluss von FBS auf die Repression des Fluoreszenzsignals	117
4.5.3	Schlussfolgerungen	119
5	Zusammenfassung	119
6	Ausblick	120
	Anhang A – Genkarten der verwendeten Plasmide	122
	Anhang B – Untersuchte Substanzen	124
	Anhang C – Vergleichsdaten	131
	Anhang D – Glossar	138
	Bestimmung des cytotoxischen Potenzials von Wasserinhalstoffen unter Verwendung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	144
	Bestimmung des gentoxischen Potenzials von Wasserinhalstoffen unter Verwendung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	153
	Bestimmung des akut toxischen Potenzials von Wasserinhalstoffen unter Verwendung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	164
	Literaturverzeichnis	174

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidest
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxylterminus einer Polypeptidkette
d	Tag (<i>dies</i>)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HIS	Histidin
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LEU	Leucin
M	Molar
m	Milli
MB	Megabase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mRNA	Messenger RNA
m/v	Massenprozent (<i>mass/volume</i>)
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminotermius einer Polypeptidkette
ODx	optische Dichte bei x Nanometern bei 1 cm Schichtdicke
o/n	Über Nacht (<i>over night</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration

RNA	Ribonucleinsäure
RP	<u>R</u> eversal <u>P</u> rimers (-)Strang-Primer
rpm	Umdrehungen pro Minute (<u>r</u> otations <u>p</u> er <u>m</u> inute)
RT	Raum <u>t</u> emperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (<u>s</u> tandard <u>d</u> eviation)
t	Tonne
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl) 1,3-Propanediol
U	Einheit der Enzymaktivität (<u>u</u> nit)
UP	<u>U</u> niversal <u>P</u> rimers (+)Strang-Primer
URA	Uracil
UV	<u>U</u> ltraviolett
V	Volumen
v/v	Volumenprozent (<u>v</u> olume/ <u>v</u> olume)
W	Gewicht (<u>w</u> eight)
WT	Wildtyp (=Wildstamm)

Innerhalb von Nucleotidsequenzen wurden die Nucleotide durch den Anfangsbuchstaben der Basen bezeichnet (A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin).

1 Einleitung

1.1 Beurteilung des Gefährdungspotenzials von Chemikalien

1.1.1 Ordnungspolitische Rahmenbedingungen

REACH

Am 01.06.2007 trat mit REACH, einem integrierten System für die Registrierung, Evaluation und Autorisierung von Chemikalien, eine europaweite Verordnung in Kraft, die sämtliche bis dahin gültige nationale Regelungen abgelöst hat. REACH sieht für Substanzen mit einer jährlichen Produktion oder Einfuhrmenge von mehr als einer Tonne die Registrierung in einer zentralen Datenbank vor. Darüber hinaus müssen Auswirkungen auf Gesundheit und Umwelt geprüft werden. Von dieser Regelung sind auch rund 30.000 der vor dem Stichtag 18.09.1981 in den Verkehr gebrachten Altstoffe betroffen. Für nach dem Stichtag eingeführte Substanzen (Neustoffe) waren bereits vor REACH Prüfungsnachweise erforderlich. Jährlich fallen rund 400 neue Stoffe unter die Registrierungspflicht. REACH schafft einen einheitlichen rechtlichen Rahmen für Alt- und Neustoffe sowie gemeinsame Standards der Risikobewertung. REACH kehrt dabei die Beweislast um, d. h. jetzt sind Hersteller, Importeure und Weiterverarbeiter in der Nachweispflicht und müssen zu allen Stoffen beurteilungsfähige Daten vorlegen, welche den gesamten Lebenszyklus einschließen. Dabei wird nach dem Prinzip „no data – no market“ verfahren. Besonders problematische Substanzen, etwa krebserzeugende, erbgutschädigende und fortpflanzungsgefährdende Stoffe oder persistente und bioakkumulierbare Stoffe, bedürfen einer gesonderten Zulassung. Diese wird nur erteilt, wenn nachgewiesen wird, dass die Risiken ausreichend kontrolliert sind und der soziale und ökonomische Nutzen überwiegt sowie alternative Substanzen nicht zur Verfügung stehen. Mit REACH sollen die von Chemikalien ausgehenden Gefahren für Arbeiter, Verbraucher und Umwelt minimiert werden.

REACH beinhaltet umfassende Prüfvorschriften für die vor Sept. 1981 in Verkehr gebrachten Altstoffe mit einer jährlichen Produktion von mehr als einer Tonne. Für die meisten der rund 30.000 davon betroffenen Substanzen fehlen die eingeforderten Daten zur Sicherheit völlig. Von diesen Stoffen sind bislang nur 140 ausreichend auf ihr Risikopotenzial hin untersucht. Vor diesem Hintergrund und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Europäische Kommission für die künftige Risikobewertung vorsieht, die Anzahl der Versuche an Tieren auf das absolut Notwendige zu reduzieren, wird der zunehmende Bedarf an alternativen aussagekräftigen Biotestverfahren deutlich.

1.1.2 Die Biotestbasierte Analytik von Umweltschadstoffen

Aufgrund des zunehmenden Eintrages chemischer Kontaminanten in das aquatische Ökosystem und sich ändernder gesetzlicher Rahmenbedingungen besteht eine wachsende Notwendigkeit, empfindliche und verlässliche Methoden zur Einschätzung des möglichen Einflusses dieser Stoffe auf die aquatischen Organismen zu entwickeln (Huggett *et al.*, 1992; McCarthy und Shugart, 1990). Der Nachweis umweltrelevanter Substanzen, d. h. von Substanzen mit einem negativen Einfluss auf die belebte Umwelt, stellt für die Umweltanalytik dabei ein zunehmendes Problem dar. Eine vollständige Erfassung des potenziell gefährlichen Schadstoffinventars einer komplexen Umweltprobe ist mit Hilfe der chemischen Analytik allein nicht möglich. Chemische Analyseverfahren sind zwar in der Lage, bereits bekannte Verbindungen auch in geringen Konzentrationen und mit großer Präzision zu detektieren. Unbekannte oder nicht überwachte Substanzen werden jedoch nicht erfasst. Darüber hinaus liegen für die Mehrheit der in komplexen Umweltproben nachweisbaren Substanzen keinerlei oder lediglich unzureichende Daten zur Toxizität vor (s. 1.1.1). Da zudem bei der Umweltüberwachung in den meisten Fällen hoch komplexe Substanzgemische untersucht werden, bei denen sich die einzelnen Bestandteile in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen (synergistische und antagonistische Effekte), liegt selbst im Falle einer Erfassung der einzelnen Substanzen durch die chemische Analytik kein geeigneter Bewertungsmaßstab in Bezug auf die tatsächliche Gefährdung vor. Aus diesem Grunde sind zusätzlich Wirkungstests erforderlich. Diese bedienen sich ökotoxikologischer Ansätze und beschreiben stets die Summenwirkung aller in der Probe enthaltenen Bestandteile, bezogen auf den jeweiligen Testorganismus. Die einfachsten Wirkungstests beruhen auf der durch die Probe verursachten Hemmung des Wachstums. Da toxische Verbindungen unabhängig von ihrem spezifischen Wirkmechanismus stets auch das Wachstum eines Organismus negativ beeinflussen, stellt der Parameter Wachstumshemmung einen zuverlässigen Bewertungsmaßstab zur Einschätzung der toxischen Eigenschaften der untersuchten Probe dar. Mikroorganismen sind aufgrund ihrer leichten Kultivierbarkeit, ihrer kurzen Lebenszyklen und ihrer schnellen Reaktion auf Umweltveränderungen für solche Wirkungstests besonders gut geeignet. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren verwenden verschiedene Mikroorganismen wie Bakterien, Algen und Ciliaten und decken somit unterschiedliche trophische Ebenen ab.

Wachstumshemmtests lassen jedoch keine mechanistische Bewertung zu. Schadstoffe können ihre Wirkung auf sehr verschiedene Weisen entfalten, z. B. durch die spezifische Hemmung bestimmter Enzyme wie etwa der Cytochromoxidase durch Cyanid oder aber auf allgemeinerer Ebene durch oxidativen Stress wie z. B. bei vielen Schwermetallen. Der Identifizierung unterschiedlicher Wirkmechanismen dient die differenzierte Endpunktanalyse wie die

Bestimmung des gentoxischen Potenzials einer Substanz oder des Einflusses einer Verbindung auf bestimmte Schlüsselfunktionen des Stoffwechsels.

Bei dem Begriff der Gentoxizität handelt es sich um einen Sammelbegriff, da der Schädigung des Erbgutes sehr unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen können (s. 1.2).

Bei den verschiedenen Nachweisverfahren für Gentoxizität ist zwischen echten Mutagenitätstests und Indikator-Testsystemen zu unterscheiden. Mutagenitätstests wie der Ames-Test (Ames *et al.*, 1973; Gee *et al.*, 1996), bei dem die Rückmutationsrate eines histidinsynthesedefekten *Salmonella typhimurium* Stammes unter Einfluss der Testsubstanz ermittelt wird, ermöglichen den *direkten* Nachweis einzelner Mutationsereignisse. Beim DNA-Schweiftest (*Comet assay*; Östling und Johanson, 1984) handelt es sich um eine elektrophoretische Auftrennungstechnik zur Visualisierung von Strangbrüchen in den DNA-Molekülen einzelner Zellen wie Protozoen, Grünalgen, Muschelzellen, primären Fischhepatozyten, Fisch- und Säugerzelllinien. Hampsey beschrieb 1991 ein Verfahren zum direkten Nachweis von Mutationsereignissen in Hefe, das auf isogenen *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen mit unterschiedlichen Basenpaar-Substitutionen in Codon 22 des *CYC1* Gens (Iso-1-Cytochrom c) beruht. Durch Rückmutationen kann die durch die Substitutionen verloren gegangene Funktion des Enzyms wiederhergestellt werden, so dass bei Selektion auf den *CYC*⁺-Phänotyp eine Abschätzung des gentoxischen Potenzials der untersuchten Probe anhand der Zahl der entstehenden Revertanten möglich ist. Weitere bekannte Verfahren, die der Gruppe der Mutagenitätstests zugeordnet werden, sind die Alkalische Filterelution (Muschel und Grünalge, Kohn und Grimek-Ewig, 1973) sowie der Chromosomenaberrations-Test (Müller *et al.*, 1982) und der Mikronucleus-Test (Countryman und Heddle, 1976) an humanen Lymphozyten.

Die so genannten Indikator-Testsysteme können Ereignisse wie Punkt-, Strangbruch-, oder Chromosomen Mutationen nicht differenzieren, sondern verwenden DNA-Reparatur Signalreporter als *indirektes Maß* einer *Gesamtschädigung*. So wird beim SOS Chromotest (Fish *et al.*, 1987; Quillardet *et al.*, 1985; Otha *et al.*, 1984; Quillardet *et al.*, 1982) die über das *lacZ*-Reporter gen nachgewiesene Induktion eines SOS Reparaturgens (*suIA*) in einem gentechnisch veränderten *Escherichia coli* Stamm als indirektes Maß für eine Schädigung der DNA verwendet. Auch der auf dem *Salmonella typhimurium* Stamm TA 1535/pSK 1002 basierende *umu*-Test (Reifferscheidt *et al.*, 1991; Oda *et al.*, 1985) beruht auf der (über *lacZ* kalorimetrisch nachweisbaren) transkriptionellen Aktivierung eines SOS Reparaturgens (*umuC*) unter Einfluss von Gentoxinen. Einfache eukaryotische Indikator-Testsysteme sind hingegen bislang kaum beschrieben. Diese bieten aber aufgrund der besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse auf höhere Organismen möglicherweise Vorteile gegenüber prokaryotischen Systemen.

1.2 DNA-Schäden und DNA-Reparatur

1.2.1 DNA-Schäden

Als DNA-Schädigung wird jede Veränderung angesehen, die zu einer Abweichung von der gewöhnlichen Doppelhelixstruktur führt. Die Struktur der DNA kann auf verschiedene Weise verändert werden: Anheften sperriger Addukte, Alkylierung, Oxidation, Dimerbildung, Depurinierung und Desaminierung. Darüber hinaus können sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche auftreten. Des Weiteren können chemische Karzinogene auch epigenetische Veränderungen verursachen, indem sie beispielsweise das Methylierungsmuster verändern und so die Expression spezifischer Gene beeinflussen.

Anheften sperriger Addukte

Bestimmte organische Verbindungen oder deren Metabolite binden kovalent an das DNA-Molekül. Das bekannteste Beispiel hierfür ist Aflatoxin. Aflatoxin wird zunächst metabolisch zu Aflatoxin-2,3-Epoxid transformiert, welches kovalent an Guanin (N^7) binden kann. Dieses Toxin wird mit spezifischen Mutationen im *p53*-Gen in Verbindung gebracht.

Alkylierung

Bei der Alkylierung handelt es sich um das kovalente Anfügen einer Alkylgruppe an eine Base (s. Abb. 1.1 c). Alkylierungen können an verschiedenen Stellen der DNA erfolgen. Sie kann in Folge einer metabolischen Aktivierung von *N*-Nitrosaminen oder durch die direkte Einwirkung von *N*-Alkylharnstoffen oder *N*-Nitrosoguanidinen auftreten. Die wesentlichen Angriffspunkte für Alkylierungsreaktionen sind: Adenin (N^1 , N^3 und N^7), Cytosin (N^3), Guanin (N^2 , O^6 und N^7) und Thymin (O^2 , N^3 und O^4). Einige dieser Veränderungen werden durch die Zelle behoben (O^6 -Methyldeoxyguanosin) andere wiederum nicht (N^7 -Methyldeoxyguanosin). Anders als bei N^7 -Methyldeoxyguanosin handelt es sich bei O^6 -Methyldeoxyguanosin um eine promutagene Veränderung (Hecht, 1999; Hecht, 1997).

Oxidation

Eine oxidative Schädigung der DNA Basen ist häufig Folge einer Exposition mit organischen Peroxiden wie Catechol, Hydroquinon oder 4-Nitroquinolin-*N*-oxid (4-NQO). Aber auch freie Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid, welche z. B. bei der Lipidperoxidation oder in Folge katalytischer Reaktionen verschiedener Enzyme (z. B. NADH-Dehydrogenase) frei werden, können oxidative Schäden am DNA-Molekül verursachen. Bestimmte Substanzen wie einige Drogen und Arzneistoffe sowie verschiedene Weichmacher (Kunststoffe) können in der Zelle die Freisetzung freier Radikale fördern (Reddy und Lalwani, 1983). Häufige Ad-

dukte oxidativer Angriffe sind Thyminglycol und 8-Hydroxydesoxyguanosin (Poulsen *et al.*, 1998).

Dimerbildung

Diese Art der DNA-Schädigung findet sich vorwiegend in Zellen, die ultravioletter Strahlung ausgesetzt waren. Dabei entstehen kovalente Bindungen zwischen zwei im DNA-Molekül benachbarten Pyrimidinbasen (s. Abb. 1.1 d). Derartige Veränderungen können auch durch chemische Mutagene wie 4-Nitroquinon verursacht werden.

Depurinierung

Hier kommt es durch Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung zwischen Purinbase (Adenin bzw. Guanin) und Desoxyribose zum Verlust der Base (s. Abb. 1.1 b). In menschlichen Zellen gehen auf diese Weise täglich allein durch thermische Schwankungen 5000 Purinbasen verloren.

Desaminierung

Eine weitere Ursache für eine Schädigung der DNA besteht in der Desaminierungsreaktion (s. Abb. 1.1 a). Dabei wird im Falle des Cytosins zunächst eine C•G-Paarung durch eine U•G-Paarung ersetzt. Wird solch eine Fehlpaarung nicht behoben, wird nach einem folgenden Replikationszyklus eine der beiden Tochter-DNA-Moleküle an dieser Position eine U•A Paarung anstelle des normalen C•G-Basenpaares enthalten. Der Austausch eines Basenpaares durch ein anderes wird als Substitution bezeichnet.

Strangbrüche

Doppelstrangbrüche treten unter Einwirkung ionisierender Strahlung und unter oxidativen Bedingungen auf. Die Folgen von Doppelstrangbrüchen sind Beeinträchtigung von Replikations- und Transkriptionsvorgängen sowie Verlust der Heterozygotität (Allelverlust).

Bei einem Einzelstrangbruch handelt es sich um eine nur einseitige Unterbrechung des Zucker-Phosphorsäure-Rückgrates. Bedeutsam sind Einzelstrangbrüche vor allem dann, wenn sie dicht benachbart zu anderen Schäden in der DNA auftreten und damit Bestandteil *komplexer* DNA-Schäden sind.

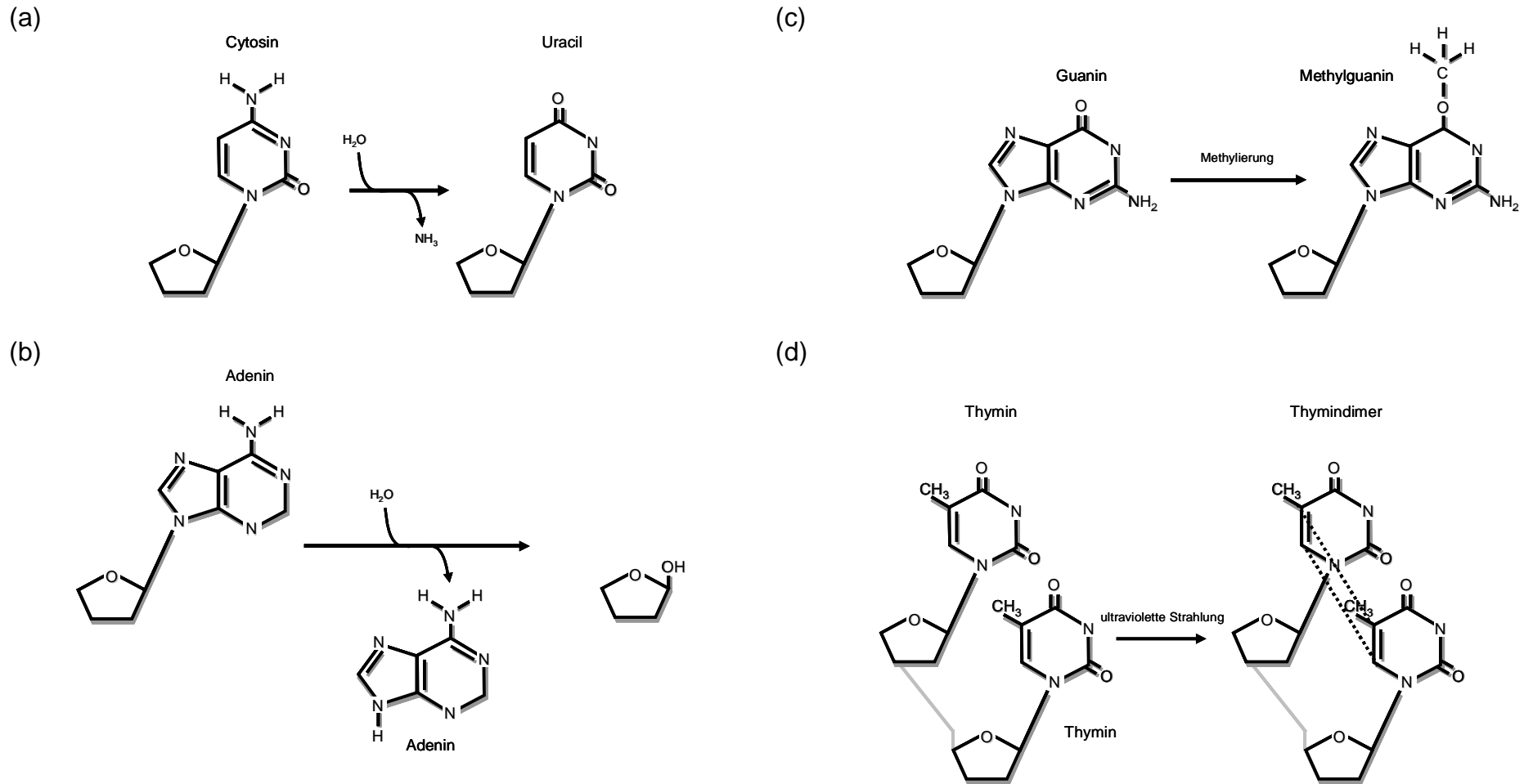


Abb. 1.1 Schädigung der DNA durch Desaminierung, Depurinierung, Alkylierung und Dimerbildung. Die dargestellten Reaktionen sind die häufigsten spontanen chemischen Reaktionen, die zu einer Schädigung des Erbgutes führen. Für jede Reaktion ist jeweils ein Beispiel angegeben. Bei der Desaminierung des Cytosin zu Uracil (a) wird C•G durch U•G ersetzt. Eine Korrektur erfolgt durch Entfernung von U. Die Depurinierung von Adenin führt zu dem Verlust des Purins (b). Es kommt zu einer Verzerrung des DNA-Doppelstranges (nicht dargestellt). Die Korrektur erfolgt durch Insertion. Die an das Guanin durch Alkylierung angefügte Methylgruppe (c) verzerrt ebenfalls die Doppelhelix (nicht dargestellt). Durch Dealkylierung kann diese strukturelle Veränderung korrigiert werden. Auch die Ausbildung eines Pyrimidindimers (d) führt zu der Verzerrung des Doppelstrangs (nicht gezeigt). Behoben wird dieser Defekt durch Excisionsreparatur.

1.2.2 Erkennung von DNA-Schäden

Über die Mechanismen zur Erkennung von DNA-Schäden ist gegenwärtig wenig bekannt. Yang postulierte 2006, dass die Erkennung von DNA-Schäden im allgemeinen über zwei Schritte erfolgt. Sensorproteine erkennen dabei zunächst eine durch destabilisierte Basenpaarbindungen verursachte höhere lokale Flexibilität des DNA-Moleküls, welche eine Konformationsänderung des angelagerten Sensorproteins zulässt. Anschließend werden Reparaturproteine rekrutiert, die die räumliche Struktur, den Zustand der Wasserstoffbrückenbindungen und die elektrostatischen Potenziale innerhalb der DNA überprüfen. Eine derartige Konformationsänderung konnte beispielsweise für MutS Homologe (*E. coli*) nachgewiesen werden. Die Änderung der räumlichen Struktur beruht hier auf dem Interkalieren eines konservierten Phenylalaninrestes in die destabilisierte DNA-Doppelhelix (Salsbury *et al.*, 2006). Die Erkennung von Pyrimidindimeren beruht in der Hefe auf dem aus Rad7p und Rad16p bestehenden Nucleotid Excisionsreparatur Faktor 4 (NEF4). NEF4 wandert unter Verbrauch von ATP an der DNA entlang, bis es an einem Pyrimidin-Dimer angelangt. Hier verursacht eine 6000fach höhere Affinität der DNA-Bindemotive C₄ und C₃HC₄ in Rad16p zur Dimerstruktur die Unterbrechung der Bewegung und ermöglicht über eine Konformationsänderung die Rekrutierung weiterer NER Faktoren wie NEF1, NEF2, NEF3 und RPA (Guzder *et al.*, 1998 a+b). C₄-Bindemotive sind auch aus anderen Erkennungssystemen wie *uvrA* (*E. coli*), Rad14 aus Hefe und menschlichen XPA Proteinen bekannt (Guzder *et al.*, 1993; Bankmann *et al.*, 1992; Robins *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1990; Navaratnam *et al.*, 1989). Darüber hinaus wird auch eine Rolle der Chromatinstruktur bei der Erkennung von Strangbrüchen diskutiert (Loizou *et al.*, 2006).

Die eigentlichen Sensoren im Menschen sind bislang nicht identifiziert. In jüngeren Studien werden verschiedene Mitglieder der Rad Familie (Rad 1, 17 und 26), der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI-3) Familie (inklusive *ATM* und *ATR*) sowie der Tumorsuppressor p53 als mögliche Sensorproteine diskutiert (reviewed in Yang *et al.*, 2004).

1.2.3 DNA-Reparaturmechanismen

Eine eingeschränkte Fähigkeit zur Reparatur von beschädigten DNA-Abschnitten spielt häufig bei der Entstehung von Krebs eine wichtige Rolle. Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* sind die häufigste Ursachen für den familiär vererbten Brustkrebs und erhöhen darüber hinaus u. a. die Inzidenz von Bauchspeicheldrüsen-, Blasen-, Dickdarm-, Prostata-, Gebärmutter- und Hautkrebs (Brose *et al.*, 2002; Thompson und Easton, 2002; Couch *et al.*, 1996). Die Funktion der beiden Gene ist zwar noch nicht vollständig aufgeklärt, beide sind aber notwendige Komponenten eines Pfades zum Schutz vor DNA-Schäden (Venkitaraman, 2002). Auch Alterungsprozesse werden auf eine nachlassende Fähigkeit zur DNA-Reparatur und einer damit einhergehenden Akkumulation insbesondere oxidativer Schädigungen zurückgeführt. Verschiedene Erbkrankheiten wie das Werner Syndrom, welche die Progerie des Erwachsenen verursacht, haben ihre Ursache in gestörten DNA-Reparaturmechanismen. Insgesamt führt eine eingeschränkte Fähigkeit zur DNA-Reparatur zu einer verkürzten Lebenserwartung des betroffenen Individuums.

Für den Umgang mit DNA-Schäden sind unterschiedliche Reparatursysteme bekannt: direkte Reparatur, Nucleotid-Excisionsreparatur, Basen-Excisionsreparatur, Rekombinationsreparatur, Fehlpaarungsreparatur und Postreplikationsreparatur (Poirier und Weston, 2002).

Direkte Reparatur durch DNA-Alkyltransferasen

DNA-Alkyltransferasen katalysieren die Translokation von Alkylgruppen alkylierter Basen wie O⁶-Methyldeoxyguanosin auf einen Cysteinrest in deren aktivem Zentrum. So steht beispielsweise die Punktmutation (G•C zu A•T) in Codon 12 des *K-ras* Onkogens, welche häufig (~50 %) bei bösartigen Tumoren des Darms vorgefunden wird, im direkten Zusammenhang mit einer Störung dieses Reparatursystems (Esteller *et al.*, 2000).

Direkte Reparatur durch Photoreaktivierung

Durch Photoreaktivierung können Pyrimidindimere beseitigt werden. Dabei bindet zunächst das Enzym Photolyase an das Dimer und spaltet unter Lichtinduktion (340-400 nm) durch eine Radikalreaktion und Elektronentransfer den Cyclobutanring, so dass anschließend die Pyrimidine wieder als Monomere vorliegen.

Nucleotid-Excisionsreparatur

Hier erkennt zunächst ein Erkennungsenzym mit einer Endonucleaseaktivität die geschädigte Stelle. Anschließend wird der DNA-Strang in einem Einschneideschritt zu beiden Seiten der geschädigten Stelle gespalten. Eine 5'→3'-Exonuclease entfernt daraufhin in einem Ausschneideschritt den eingegrenzten Teil des beschädigten Stranges. Es verbleibt ein Be-

reich einzelsträngiger DNA, der einer DNA-Polymerase im Syntheseschritt als Matrize zum Neuaufbau des entfernten Bereichs dient. Das 3'-Ende des neu synthetisierten Strangs wird abschließend durch eine DNA-Ligase mit dem 5'-Ende des alten Materials verbunden. So werden beispielsweise Pyrimidindimere durch Nucleotid-Excisionsreparatur beseitigt. Defekte in diesem Reparatursystem stehen im Zusammenhang mit den Erbkrankheiten Xeroderma pigmentosum (XP), Trichothiodystrophie (TTD, betroffene Gene: *XPB* und *XPD*) und dem Cockayne Syndrom (CS, betroffene Gene: *ERCC6* u. *ERCC8*). XP beispielsweise führt zu einer Überempfindlichkeit gegenüber Sonnenlicht, was verschiedene Hauterkrankungen zur Folge hat und die Prävalenz neoplastischer Veränderungen bei den unter 20jährigen Betroffenen um den Faktor 2000 erhöht. Zellen aus XP-Patienten zeigen eine um 10-100 % reduzierte Fähigkeit, Pyrimidindimere und andere sperrige Addukte zu beseitigen. Man unterscheidet bei dieser Erkrankung acht genetische Komplementierungsgruppen, von denen sieben einen Defekt im Einschneideschritt aufweisen. Eine weitere Gruppe ist durch das Fehlen der DNA-Polymerase *hRAD30A* (Pol H) gekennzeichnet (Lehmann, 2003)

Basen-Excisionsreparatur

Bei der Basen-Excisionsreparatur wird durch eine Glycosylase lediglich die veränderte Base (z. B. 3-Methyladenin) nicht aber das gesamte Nucleotid entfernt. Der verbleibende Phosphatzucker wird durch AP-Endonucleasen und Phosphodiesterasen entfernt (die gleichen Enzyme sind auch für die Reparatur von depurinierten Stellen verantwortlich). Die Lücke wird anschließend durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt und die freien Enden durch DNA-Ligasen miteinander verbunden. Bezüglich der Art der erkannten DNA-Schäden gibt es Überlappungen mit dem direkten Reparatursystem.

Rekombinationsreparatur

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (Abb. 1.2 a) erfolgt durch homologe Rekombination. Der Strangbruch wird durch Endonucleasen zu einer Lücke mit 3' Überhängen ausgeweitet (b). Eines der überhängenden Enden bildet mit dem homologen Bereich des Donordoppelstranges (schwarz) einen Heteroduplex-DNA-Komplex. Dabei wird eine so genannte D-Schleife ausgebildet, in der ein Strang des Donordoppelstranges verdrängt wird (c). Die Ausbildung der D-Schleife ist in Hefe von Rad54p (s. u.) abhängig (Petukhova *et al.*, 1998). Die Schleife wird durch Reparatursynthese vom 3'-Ende ausgehend verlängert (d). Entspricht die Größe der Schleife schließlich der Länge der Lücke im Empfängerstrang, verbinden sich die komplementären Einzelstrangsequenzen des verdrängten Stranges und des verbleibenden 3'-Überhanges des Empfängerdoppelstranges (e). Anschließend wird der Bereich der Lücke ausgehend vom 3'-Ende durch Reparatursynthese aufgefüllt (f), Nun befinden sich auf beiden Seiten der ehemaligen Lücke Heteroduplex-DNA-Abschnitte. Die letz-

te Graphik (g) zeigt die Wanderung des Kreuzungspunktes. Das Molekül weist zwei rekombinante Verbindungen auf. Die Trennung der beiden Doppelstränge erfolgt durch Endonucleasen. An diesem Prozess beteiligt sind beim Menschen die Genprodukte der Gene *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *HRAD51B*, *HRAD52*, *RPA*, und *ATM* (Yu *et al.*, 1999).

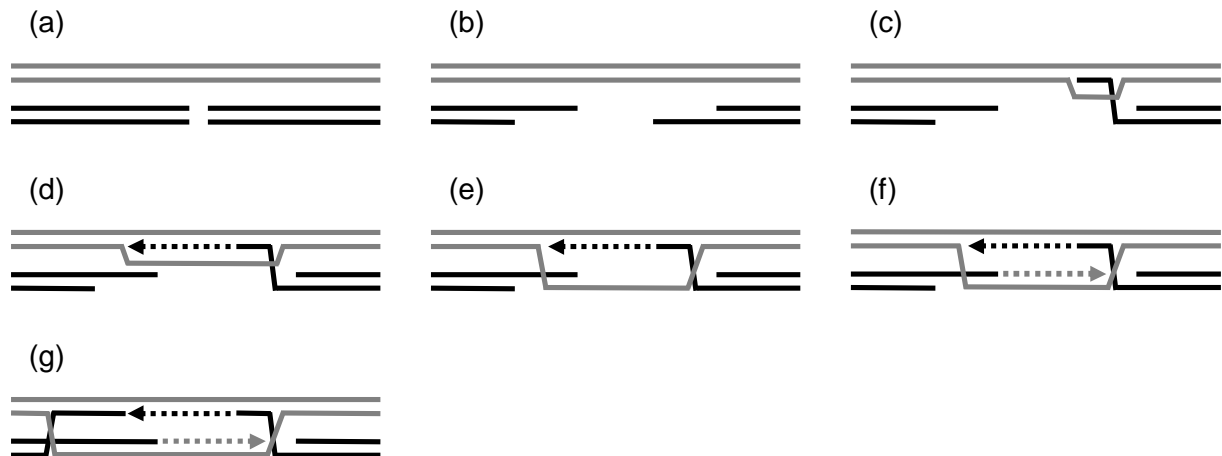


Abb. 1.2 Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination. (nach Lewin *et al.*, 1998, S.434). Die genaue Beschreibung des Vorgangs ist im Fließtext gegeben.

Fehlpaarungsreparatur

Fehlgepaarte Basen können während der Replikation oder bei der Excisionsreparatur entstehen, wenn konventionelle, jedoch nicht komplementäre Basen in den neu synthetisierten Strang eingebaut werden. Die Reparatur solcher Fehlpaarungen ähnelt der Nucleotid-Excisionsreparatur, wobei hier jedoch ein sehr viel größerer DNA-Abschnitt entfernt wird, da das die Fehlpaarung erkennende Protein gleichzeitig an die Fehlpaarung und ein unmethyliertes Adenin einer GATC Erkennungssequenz binden muss, so dass der gesamte zwischenliegende Bereich entfernt wird. Der verbleibende Strang dient als Matrize für eine Polymerase. Transitionen (G•T oder A•C) werden durch dieses System effizienter beseitigt als Transversionen (G•G, A•A, G•A, C•C, C•T und T•T).

Postreplikationsreparatur

Werden Pyrimidindimere nicht beseitigt, kommt es bei einer anschließenden Replikation im Matrizenstrang zu einer Unterbrechung des Replikationsprozesses, da DNA-Poylmerasen nicht in der Lage sind, Dimere zu überspringen. Die DNA-Synthese wird daher unter Bildung von Okazaki-Fragmenten jenseits des Dimers fortgesetzt. Das Replikationsprodukt enthält daher an der entsprechenden Stelle eine Lücke. Durch Rekombination zwischen dem lückenhaften Teil und dem intakten Tochterstrang kommt es zu einem Strangaustausch. Anschließend liegt ein Molekül mit einem intakten und einem die Dimere enthaltenen Strang

vor. Das andere Tochtermolekül enthält einen intakten Strang und einen komplementären Strang, der die Lücke enthält. Da beide Doppelstränge nun über einen intakten Strang verfügen, können die Dimere durch Excisionsreparatur (s. o.) entfernt werden und sämtliche Lücken durch eine Polymerasereaktion geschlossen werden.

1.2.4 Der Einfluss von DNA-Schäden auf Zellzyklus und Genexpression

Eukaryotische Zellen reagieren auf die Schädigung ihrer DNA zunächst mit einem Zellzyklusarrest. Der Arrest kann dabei an vier verschiedenen Kontrollpunkten erfolgen: Am Übergang von G1 in die S Phase (G1/S-Kontrollpunkt), an dem entschieden wird, ob die Zellmasse für eine Teilung ausreichend ist und die äußeren Bedingungen (z. B. Nährstoffangebot) günstig sind. Während der S-Phase wird die Integrität der DNA überprüft. Der Kontrollpunkt wird als S-Phasen-Kontrollpunkt bezeichnet. Und schließlich kann sowohl am S/M- als auch am G2/M-Kontrollpunkt der Eintritt in die Mitose verhindert werden (Weinert, 1998; Longhese *et al.*, 1998; Elledge, 1996). An welchem Kontrollpunkt im Zellzyklus es bei Schädigung zum Arrest kommt, hängt von der Art der Schädigung und deren Auswirkung ab. Doppelstrangbrüche beispielsweise verursachen einen Arrest am G2/M-Kontrollpunkt, wodurch die mitotische Teilung unterbunden wird, um einen Verlust von Chromosomfragmenten während des Teilungsvorganges zu verhindern (Weinert *et al.*, 1989; Weinert *et al.*, 1988). Modifikationen an einzelnen Basen (z. B. Methylierung durch MMS) führen zu einem S-Phasen-Arrest, so dass die Replikation fehlerhafter DNA verhindert wird (Paulovich *et al.*, 1995).

Die Regulation des Zellzyklus und dessen Arrest erfolgt durch Phosphorylierungskaskaden. Diese Signalübertragungswege sind bei den Eukaryoten hoch konserviert. An der Spitze dieser Kaskade steht eine Familie den Phosphatidylinositol-Kinasen verwandter Proteine. Bei den Säugern sind das die ATM- (*ataxia telangiectasia mutated gene*; Painter *et al.*, 1980) und die ATR-Kinasen (*ATR-Rad3-related*). Die homologen Gegenstücke in Hefe sind Mec1p und Tel1p (Zhou und Elledge, 2000). Unterhalb dieser Kinasen stehen zwei Serin/Threoninkinase-Familien, nach ihrer Funktion als CHKs (*checkpoint kinases*) bezeichnet. In Säugerzellen sind diese CHK1 und CHK2. Die homologen Proteine in Hefe sind Chk1p und Rad53p als homologes Gegenstück zu CHK2. Rad53p reguliert eine weitere Kinase, Dun1p. Sowohl Dun1p als auch Chk1p sind in der Zellzykluskontrolle involviert und regeln die Expression von Genen, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Teile dieser Signaltransduktionskaskade üben darüber hinaus einen Einfluss auf die Aktivierung von DNA-Reparatur-Mechanismen aus. Dun1p reguliert so auch die Expression von Genen, die bei der Beseitigung von DNA-Schäden eine Rolle spielen (Zhou und Elledge, 2000). Am besten ist das für die *RNR*-Gene untersucht, die für verschiedene Untereinheiten der Ribonucle-

otidreduktase kodieren. Dieses Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Desoxyribonucleotid Synthese (Stubbe *et al.*, 1995; Stubbe, 1990). In der Hefe ist unter normalen Bedingungen die Expression dreier von insgesamt vier Genen durch den, von Dun1p regulierten, Crt1p Repressor unterdrückt. Beschädigungen an der DNA führen über den beschriebenen Mec1-Signal-Transduktionsweg jedoch zu einer Inaktivierung von Crt1p, wodurch die Repression der RNR-Genen aufgehoben wird (Huang *et al.*, 1998). Gasch *et al.* (2001) konnten ein ganzes Cluster von Genen identifizieren, deren Expression spezifisch als Reaktion auf die Schädigung der DNA induziert wird. Dazu gehören neben den bereits erwähnten *RNR*-Genen die Gene *YER004W* und *YBR070C*, deren Funktion bislang unbekannt ist, das *DUN1*-Gen (s. o.) sowie die DNA-Reparaturgene *RAD51* und *RAD54* (s. Abschnitt 1.2.5). Dieses Cluster von Genen wird sowohl unter Einwirkung der methylierenden Substanz MMS als auch von ionisierender Strahlung, die vorwiegend Doppelstrangbrüche verursacht, induziert (s. Abb. 1.3). Die Induktion des gleichen Clusters wird auch durch die (ultraviolette Strahlung nachahmende) Substanz 4-Nitroquinon und den RNR-Inhibitor Hydroxyharnstoff verursacht (Gasch *et al.*, 2001). Durch die HO-Endonuclease verursachte Doppelstrangbrüche führen zur Induktion eines sehr ähnlichen Clusters (Lee *et al.*, 2000). Die Gene dieses Clusters werden demnach unabhängig von der Art der Schädigung und unbeeinflusst vom Kontrollpunkt, an dem es zum Zellzyklusarrest kommt, induziert. Die Induktion hängt dabei in direktem Maße von der Schwere der Schädigung ab.

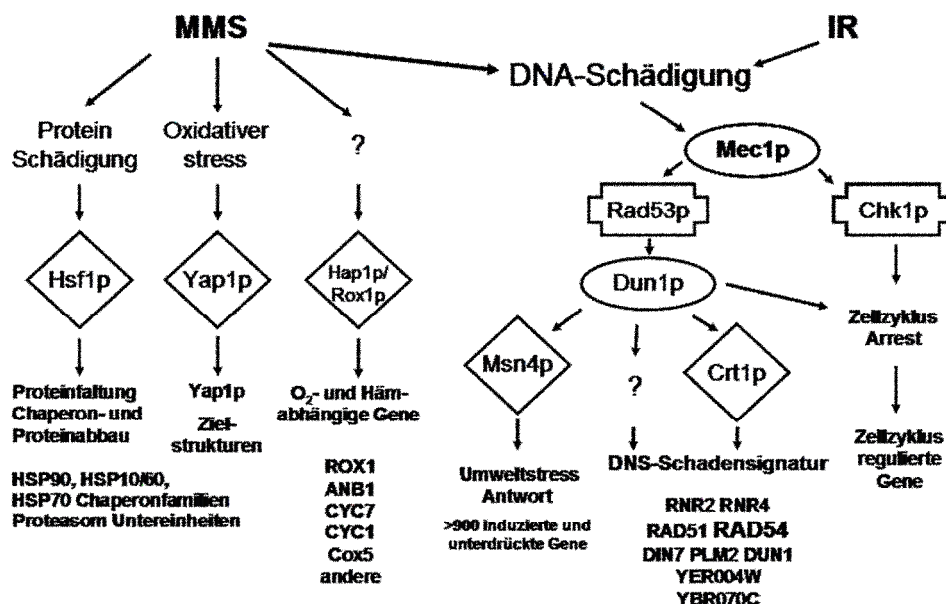


Abb. 1.3 Auswirkung von MMS und ionisierender Strahlung (IR) auf die Genexpression in Hefe. (nach Gasch *et al.*, 2001). Die Abbildung zeigt wesentliche Merkmale der veränderten Genexpression bei MMS bzw. IR Exposition. Beteiligte Transkriptionsfaktoren sind als \diamond dargestellt, Proteinkinasen als \square und zelluläre Signalgeber, die die entsprechenden Reaktionen auslösen als \circ .

1.2.5 Die Funktion von Rad54p

In *S. cerevisiae* wurden Gene, die an Reparaturvorgängen beteiligt sind zunächst in Mutanten mit einer erhöhten Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung identifiziert. Aufgrund dieser Empfindlichkeit wurden die betroffenen Gene in Anlehnung an den englischen Begriff für Strahlung – *radiation* – als *RAD* Gene bezeichnet. Die Reparaturgene der Hefe werden dabei in drei allgemeine Gruppen eingeteilt: Die *RAD3*-Gruppe ist an der Excisionsreparatur (s. 1.2.3) beteiligt. Die Mitglieder der *RAD6*-Gruppe werden für die Postreplikationsreparatur (s. 1.2.3) benötigt. Und schließlich sind die Mitglieder der *RAD52*-Gruppe an rekombinationsähnlichen Mechanismen beteiligt (Lewin *et al.*, 1998). Das *RAD54* Gen gehört zur *RAD52*-Gruppe. Sowohl Struktur als auch Funktion von Rad54p sind bei den Eukaryoten stark konserviert (Bezzubova *et al.*, 1997; Esser *et al.*, 1997); so zeigt das homologe Protein im Menschen eine 52%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz (Rasio *et al.*, 1997). Es scheint jedoch kein prokaryotisches Gegenstück zu existieren. Das Rad54-Protein ist ein Mitglied der wachsenden Swi2/Snf2 Proteinfamilie. Wie bei allen Mitgliedern dieser Proteinfamilie finden sich in Rad54 helicaseähnliche Motive (Eisen *et al.*, 1995). DNA-Helicase Aktivität konnte aber bislang für keines der Swi2/Snf2 Familienmitglieder nachgewiesen werden (Pazin *et al.*, 1997). Rad54 verfügt jedoch über Sequenzmotive, die die Fähigkeit nahe legen, ATP zu binden und zu hydrolysieren. Tatsächlich konnte für Rad54p eine deutliche ATPase-Aktivität gezeigt werden (Abb. 1.4, Petukhova *et al.*, 1998). Die Funktion von Rad54p liegt in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination (s. Abb. 1.2.3). Dabei leitet Rad54p selbst nicht die homologe Rekombination ein. Vielmehr steigert es bereits in katalytischen Mengen die Aktivität von Rad51p, welches die Paarung zwischen einem einzelsträngigen DNA Molekül und dessen homologem linearen, doppelsträngigen Gegenstück unter Ausbildung einer D-Schleife initiiert. Solch eine Struktur repräsentiert einen wesentlichen Vorgang der Rekombination *in vivo*. Ohne Beteiligung von Rad54p ist Rad51p nicht in der Lage, diese Struktur auszubilden. Vermutlich bildet der Rad51p/DNA-Komplex zunächst das Gerüst, auf das Rad54p aufsetzt und die homologe DNA-Paarung unter ATP-Hydrolyse begünstigt, wobei eine oder gleich mehrere kinetische Barrieren überwunden werden (Petukhova *et al.*, 1998). In Abbildung 1.2 c ist die Ausbildung einer D-Schleife, wie sie gemeinsam durch Rad51p und Rad54p begünstigt wird, dargestellt.

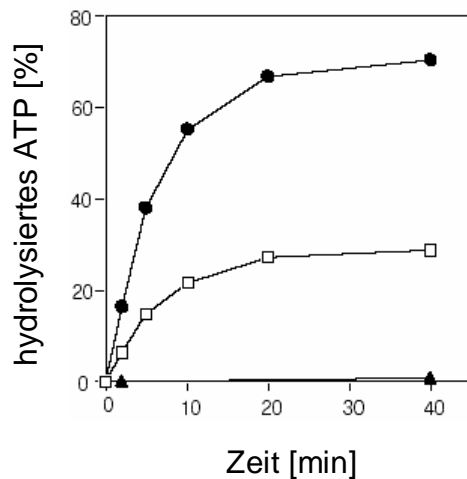


Abb. 1.4 Rad54 DNA-abhängige ATPase-Aktivität. (aus Pethukhova *et al.*, 1998). ATP-Hydrolyse durch aufgereinigtes Rad54p (60 ng) ohne DNA (▲), mit 100 ng einzelsträngiger DNA (□) und mit 200 ng doppelsträngiger DNA (●) nach der jeweils angegebenen Inkubationszeit.

Rad54p nimmt demnach eine zentrale Rolle bei der Rekombinationsreparatur in Hefe ein. Das Expressionsniveau des *RAD54* Gens ist schadensabhängig und wird durch regulatorische Promotorsequenzen (DRS element) gesteuert, welche in der Region von -99 und -70 vor dem Transkriptionsstart liegen (Cole und Mortimer, 1989). Der *RAD54* Promotor scheint daher in Verbindung mit einem entsprechenden Reportergen gut geeignet zu sein, Schadensereignisse an der DNA (indirekt) nachzuweisen und damit die Einschätzung des genotoxischen Potenzials einer Probe in *S. cerevisiae* zu ermöglichen.

1.3 Die Regulation des PMA1-Promotors unter Einfluss exogener Stressfaktoren

Die Expression von mehr als 900 Genen (etwa 14 % aller gegenwärtig postulierten Hefegene) wird durch verschiedenste exogene Stressfaktoren wie z. B. Hitze, oxidativen Stress, erhöhte Osmolarität oder extreme Wasserstoffionenkonzentrationen auf erstaunlich einheitliche Weise beeinflusst (Gasch *et al.*, 2000). Die Repression von am Zellwachstum beteiligten Genen (~600), wie denen des RNA-Stoffwechsels, der Nucleotid-Biosynthese, von ribosomalen Proteinen etc. ermöglicht das Einsparen von Energie, wohingegen die Induktion anderer Gene (~300) dem Schutz kritischer Elemente basaler Zellfunktionen dient. Die Gene dieser Gruppe sind am Kohlehydratstoffwechsel, an zellulären Redoxreaktionen, der Proteinfaltung und dem Proteinabbau, dem Fettsäurestoffwechsel, an Transportprozessen, an der DNA Reparatur und an einigen anderen Prozessen beteiligt (Gasch *et al.*, 2000). Die betroffenen Gene sind häufig durch spezifische regulatorische Sequenzen gekennzeichnet (Waring *et al.*, 2003; Gasch *et al.*, 2001), die von spezifischen Proteinen oder Transkriptionsfaktoren

erkannt werden. Einige dieser regulatorischen Sequenzen wurden auch im Promoterbereich des *PMA1* Gens gefunden (s. u.). Bei dem für die wichtigste Plasmamembran- H^+ -ATPase codierenden *PMA1* Gen handelt es sich um eines der bedeutendsten Haushaltsgene in *S. cerevisiae* (Serrano *et al.*, 1986), welches für die Lebensfähigkeit dieses Einzellers von essentieller Bedeutung ist. Die hoch konservierte P-Typ ATPase aus der E2 Familie besteht aus einem einzelnen Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 100 kDa (Dufour und Goffeau, 1978), das über zehn hydrophobe Segmente in der Plasmamembran verankert ist (Ambesi *et al.*, 2000). Diese durch die Spaltung von ATP getriebene Protonenpumpe ist für den Transport von Protonen aus der Zelle und damit für den Aufbau des elektrochemischen Potentials über der Zellmembran verantwortlich, über den der sekundär aktive Transport von lebenswichtigen Stoffen wie Zucker, Aminosäuren, Nucleosiden und Kalzium durch die Plasmamembran angetrieben wird (Fernandes und Sá-Correia, 2003; Cid *et al.*, 1987; Ulaszewski *et al.*, 1987; Boutry *et al.*, 1977; Foury *et al.*, 1977; Foury und Goffeau, 1975). Darüber hinaus ist Pma1p an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes beteiligt (Eraso und Gancedo, 1987; Ulaszewski *et al.*, 1987). Als Hauptproteinbestandteil der Plasmamembran (15-50 % des Gesamtplasmaproteins; Serrano, 1991; Serrano, 1988) ist diese Protonenpumpe für 25-40 % (Rao und Slayman, 1996; Gradmann *et al.*, 1978) des zellulären ATP-Verbrauchs verantwortlich. Aufgrund der essentiellen Bedeutung dieses Proteins wird das *PMA1* Gen konstitutiv exprimiert, reguliert von zwei verschiedenen Systemen: (i) Dem TUF/RPG/RAP1 System, für das sich zwei Konsensussequenzen in der Promotorregion finden lassen. Dieses System ist auch an der Regulation von Genen der Glycolyse, des aktiven Transportes, der Transkription und der Translation beteiligt (Capieaux *et al.*, 1989). (ii) Dem MCM1 Protein mit einer Konsensussequenz. MCM1p ist darüber hinaus an der Regulation von Genen beteiligt, die bei der Zellzykluskontrolle, der Zellwandsynthese und bei der Aufrechterhaltung von Membranstrukturen eine Rolle spielen (Kuo and Grayhack, 1994). Des Weiteren ist der 5'-Bereich der *PMA1* Promotorregion durch vier putative regulatorische Elemente gekennzeichnet: Drei HAP2/3/4/5 Konsensussequenzen und ein *stress response element* (STRE), welche möglicherweise an der transkriptionellen Regulation des *PMA1* Gens unter Stressbedingungen wie Glucosemangel, erhöhtem oxidativen Stress und einem herabgesetzten cAMP-Spiegel beteiligt sind (Fernandes and Sá-Correia, 2003; Boy-Marcotte *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Umweltstressfaktoren (indirekt) zur Inhibierung des *PMA1* Promotors führen können (Monteiro *et al.*, 1994; Viegas *et al.*, 1994; Viegas *et al.*, 1995). Aufgrund der Inhibierung des *PMA1* Promotors unter physiologischem Stress und der zentralen Bedeutung des *PMA1* Gens für den Stoffwechsel der Hefe erscheint dieser Promotor als geeignet, in Verbindung mit dem entsprechenden Reportergen den negativen Einfluss einer Probe auf den basalen Stoffwechsel der Zelle auf indirektem Wege nachzuweisen.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

S. cerevisiae als der einfachste eukaryotische Organismus teilt mit vielzelligen Eukaryoten wie Pflanzen und Tieren einen im Grunde übereinstimmenden Zellzyklus, die gleiche zelluläre Architektur und viele gemeinsame Stoffwechselwege. Ein auf diesem Mikroorganismus beruhendes Testsystem zum Nachweis toxischer Eigenschaften verbindet daher die Vorteile prokaryotischer Verfahren, wie die einfache und damit kostengünstige Kultivierung und die kurze Versuchsdauer, mit den Vorzügen von (eukaryotischen) Zellkulturen, wie die höhere Aussagekraft in Bezug auf den Menschen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines auf dem Modellorganismus Hefe basierenden Verfahrens zum Nachweis probenassoziierter Toxizität unter Berücksichtigung der Endpunkte Wachstumshemmung, Gentoxizität und metabolische Aktivität und die Darlegung der Funktionalität der einzelnen Verfahren.

Wachstumshemmende Effekte wurden über eine verminderte Trübungszunahme bei steigenden Substanzkonzentrationen bestimmt.

Der Nachweis gentoxischer Effekte erfolgte indirekt über eine *RAD54* Promotor vermittelte GFP-Induktion. *RAD54* gehört zu einem Cluster von Genen, deren Expression spezifisch als Reaktion auf die Schädigung der DNA induziert wird. Das Expressionsniveau von *RAD54* wird über regulatorische Sequenzen gesteuert und ist abhängig von der Schwere des DNA-Schadens. Rad54p steht stellvertretend für eine Reihe von an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligten Proteinen.

Die metabolische Aktivität wurde über die transkriptionelle Inhibierung einer PMA1-Promotor vermittelten GFP-Expression indirekt nachgewiesen. PMA1 ist das wichtigste Haushaltsgen der Hefe. Das Expressionsniveau dieses Gens wurde als stellvertretend für den metabolischen Gesamtzustand der Zelle angesehen.

2 Material und Methoden

2.1 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefestämme

Tab. 2.1 In dieser Arbeit verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Bezeichnung	Plasmid	relevanter Genotyp	Herkunft
PLY232		<i>MATa his3D200 leu2-3 112 trp1D901 ura3-52 suc2D9</i>	Bertl <i>et al.</i> , 2003
FY1679-28C (Wildstamm)		<i>MATa ura 3-52 trpD63 leu2D1 his3D200 GAL2+</i>	Kolaczowski <i>et al.</i> , 1998
FYAK26/8-10B1 (sensitive Mutante)		<i>MATa ura3-52 trpD63 leu2D1 his3D200 GAL2+ pdr5D1::his G snq2::hisG yor1::hisG</i>	Kolaczowski <i>et al.</i> , 1998
HLYRGI (Indikatorstamm: Gentoxizität)	pY-P _{RAD54-s} -yEGFP3	wie FYAK 26/8-10B1 plus [P _{RAD54-s} -yEGFP3 <i>URA3 LEU2</i>]	diese Arbeit
HLYRGlc (Kontrollstamm: Gentoxizität)	pY-P _{RAD54-s} -yEGFP3Δ	wie FYAK 26/8-10B1 plus [P _{RAD54-s} , <i>URA3 LEU2</i>]	diese Arbeit
HLYRGII (Indikatorstamm: Akute Toxizität)	pYEX-P _{PMA1} -yEGFP3/PEST	wie FYAK 26/8-10B1 plus [P _{PMA1} -yEGFP3/PEST, <i>URA3 LEU2</i>]	diese Arbeit
HLYRGIIc (Kontrollstamm: Akute Toxizität)	pYEX-P _{PMA1} -yEGFP3	wie FYAK 26/8-10B1 plus [P _{PMA1} -yEGFP3, <i>URA3 LEU2</i>]	diese Arbeit

Tabelle 2.2: Genetische Nomenklatur in Hefe für YFG1 (*your favourite gene*)

Bezeichnung	Beschreibung
<i>YFG1</i>	Wildtyp Allel
<i>yfg1-1</i>	Rezessives Mutanten Allel
<i>YFG1-2</i>	Dominantes Mutanten Allel
<i>yfg1D</i>	Deletion des Allels von <i>YFG1</i>
<i>yfg1::URA3</i>	Disruption von <i>YFG1</i> mit <i>URA3</i> -Disruptionskassette
Yfg1 ⁺	Phänotyp von <i>YFG1</i>
Yfg1 ⁻	Phänotyp der Mutante
Yfg1p	Produkt (Protein) von <i>YFG1</i>
[YFG1]	Episomale Expression

2.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Tab. 2.3 In dieser Arbeit verwendeter *Escherichia coli* Stamm

Bezeichnung	relevanter Genotyp
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'roAB lac^aZDM15TN10 (Tet^r)]</i>

2.3 Nährmedien

2.3.1 Medium für Stamm-, Übernacht- und Vorkulturen (einfach konzentriert)

YNB (<i><u>Y</u>east <u>N</u>itrogen <u>B</u>ase</i>) Medium	1,7 g
Aminosäure <i>Drop-Out</i> -Mischung	0,5 g
Zitronensäure Monohydrat	10,5 g (final: 50 mM)
A. bidest	Ad 1000 ml
Agar (nur für Stammkultur)	20 g

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung je nach Fragestellung auf 4,75 bzw. 6,4 eingestellt.

Nach der Dampfsterilisation (120 °C, 20 min) werden der Lösung unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen 12,5 ml einer 40%igen Glucose-Stocklösung (Finalkonzentration: 0,5 % [m/v]) zugegeben. Abschließend werden dem Nährmedium 10 ml der Supplement-Stocklösung zugegeben.

2.3.2 Medium für Vorkulturen bei Testung komplexer Proben (fünffach konzentriert)

Zur Erhöhung des Probenanteils in den Ansätzen kann ein fünffach konzentriertes Nährmedium verwendet werden. Die Verwendung des konzentrierten Mediums ist bei komplexen Proben unerlässlich, kann aber auch bei Monosubstanzen nötig werden.

YNB (<i><u>Y</u>east <u>N</u>itrogen <u>B</u>ase</i>) Medium	8,5 g
Aminosäure <i>Drop-Out</i> -Mischung	2,5 g
Zitronensäure Monohydrat	52,5 g (250 mM)
A. bidest	Ad 1000 ml

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung je nach Fragestellung auf 4,75 bzw. 6,4 eingestellt.

Nach der Dampfsterilisation (120 °C, 20 min) werden der Lösung unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen 62,5 ml einer 40%igen Glucose-Stocklösung (Finalkonzentration: 2,5 % [m/v]) zugegeben. Abschließend werden dem Nährmedium 50 ml der Supplement-Stocklösung zugegeben.

2.3.3 Medium für Vorkulturen bei Testung akut toxischer Effekte in serumhaltiger Umgebung (einfach konzentriert)

Zur Simulation von Bedingungen, wie sie im Blut vorherrschen, und deren Auswirkung auf das toxische Potenzial von Monosubstanzen und unbekannten Proben wird ein serumhaltiges Nährmedium verwendet. Die unten stehenden Angaben beziehen sich auf einen Ansatz von 200 ml.

YNB (<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase) Medium	0,34 g
Aminosäure <i>Drop-Out</i> -Mischung	0,1 g
Zitronensäure Monohydrat	2,1 g (final: 50 mM)
A. bidest	Ad 160 ml

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung auf 6,4 eingestellt.

Nach der Dampfsterilisation (120 °C, 20 min) werden der Lösung unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen 2,5 ml einer 40%igen Glucose-Stocklösung (Finalkonzentration: 0,5 % [m/v]) zugegeben. Abschließend werden dem Nährmedium 2 ml der Supplement-Stocklösung zugegeben. Darüber hinaus werden 40 ml fetales Rinderserum (FBS) hinzugefügt. Das Nährmedium wird vorsichtig durch mehrmaliges Invertieren durchmischt (eine zu heftige Durchmischung verursacht eine übermäßige Schaumbildung). Das Nährmedium ist bei 4 °C zu lagern und nicht länger als eine Woche zu verwenden.

2.3.4 Aminosäure *Drop-Out*- Mischung

Aminosäure	CAS-Nummer	Einwaage*
Adenin	73-24-5	250 mg
Tryptophan	73-22-3	500 mg
Arginin	74-79-3	100 mg
Methionin	63-68-3	100 mg
Tyrosin	60-18-4	150 mg
Lysin	56-87-1	150 mg
Valin	72-18-4	300 mg
Threonin	72-19-5	500 mg
Serin	56-45-1	500 mg
Phenylalanin	63-91-2	250 mg
Asparagin	70-47-3	100 mg
Glutaminsäure	56-86-0	100 mg

* oder ein Vielfaches

2.3.5 Supplement-Stocklösungen

Uracil Stocklösung:

2 mg/ml Uracil (CAS 66-22-8) in A. bidest lösen und sterilfiltrieren (0,22 µm)

Leucin Stocklösung:

4 mg/ml L-Leucin (CAS 61-90-5) in A. bidest lösen und sterilfiltrieren (0,22 µm)

Histidin Stocklösung:

2 mg/ml L-Histidin (CAS 71-00-1) in A. bidest lösen und sterilfiltrieren (0,22 µm)

2.3.6 Stocklösung der Kohlenstoffquelle

40%ige D-Glucose Stocklösung:

40 g D-Glucose (CAS 50-99-7) werden in 100 ml A. bidest gelöst und anschließend dampfsterilisiert (120 °C, 20 min).

2.3.7 Nährmedium zur Anzucht von *E. coli*: LB-Medium

Die Nährmedien zur Anzucht von *E. coli* wurden als Teilfertigprodukt von der Firma *International Diagnostics Group Plc.* bezogen und den Herstellerangaben entsprechend angesetzt.

LB-Flüssigmedium: 25 g/l

LB-Festmedium: 40 g/l

Medienbestandteile pro Liter:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
(Agar)	15 g
A. bidest	ad 1000 ml

Zur Herstellung von Selektionsmedien ist dem Nährmedium nach der Dampfsterilisation (120 °C, 20 min) das entsprechende Antibiotikum hinzuzufügen.

2.3.8 Nährmedium zur Herstellung kompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen: SOB-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,19 g
A. bidest	ad 1000 ml

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung auf einen Wert von 7,0 eingestellt.

Die Lösung wird anschließend dampfsterilisiert (120 °C, 20 min).

2.4 Quantifizierung von Nucleinsäuren

2.4.1 Ethidiumbromid-Fluoreszenz

Referenz:
Sambrook *et al.*, 1989

Zur Anfärbung nucleinsäurehaltiger Agarose Elektrophorese Gele (s. u.) wurde Ethidiumbromid (EtBr) verwendet. Diese Substanz interkaliert in doppelsträngige Nucleinsäurehelices. Der resultierende Nucleinsäure-EtBr-Komplex fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht (302 nm) rot.

Zur Anfärbung werden dem Gel etwa 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung kann das Gel unter UV-Licht betrachtet werden, da die Fluoreszenz des in doppelsträngige Nucleinsäuren interkalierten Ethidiumbromids gegenüber dem nicht interkalierten Farbstoff um mehr als das 20fache erhöht ist. Eine Entfärbung des Hintergrundes ist aus diesem Grunde nicht erforderlich.

Zur Bestimmung von Konzentration und Größe der in der eigenen Probe vorhandenen Nucleinsäure wird ein geeigneter Längenstandard verwendet. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Banden dieses Standards, deren Konzentrationen bekannt sind, mit der der Probe ermöglicht die Abschätzung der Konzentration.

Die Größe der eingesetzten Nucleinsäure wird durch den Vergleich der von der Probe im Gel zurückgelegten Strecke mit der zurückgelegten Strecke der Banden des Längenstandards, deren jeweiligen Größen bekannt sind, ermittelt.

2.4.2 Bestimmung der optischen Dichte

Referenz:
Sambrook *et al.*, 1989

Durch die Messung der Extinktion einer nucleinsäurehaltigen Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm respektive von 280 nm lassen sich Menge und Reinheit der in der Probe enthaltenen Nucleinsäuren berechnen.

Berechnung der Konzentration:

Doppelsträngige DNA: $50 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260}$

Einzelsträngige DNA und Oligonucleotide: $33 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260}$

RNA: $40 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260}$

Bestimmung der Reinheit: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$

2.5 Präparation von Nucleinsäuren:

2.5.1 Bakterien Plasmid-Mini-Präparation durch alkalische Lyse

Referenz:
Sambrook *et al.*, 1989

Zur Überprüfung von Klonierungen wurde folgendes Kurzprotokoll verwendet. Dieses Protokoll ist jedoch nicht zur Herstellung lagerungsfähigen Materials geeignet. Für die Herstellung solcher Aufreinigungen ist das in 2.5.2 beschriebene Protokoll zu verwenden.

- Transformierte Bakterien (s. u.) werden in entsprechendem LB-Selektionsmedium 12-18 h bei 37 °C angezogen.
- Bis zu 3 ml der Bakterienkultur werden in einer Tischzentrifuge für 30 s bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert.
- Der Überstand wird verworfen und der Niederschlag in 50 µl Resuspendierungspuffer (s. u.) aufgenommen. Dabei sollte sich der Niederschlag vollständig auflösen.
- Die Lyse der Zellen erfolgt durch Zugabe von 65 µl des Lysepuffers (s. u.) und einer drei- bis maximal fünfminütigen Inkubation.
- Die Lyse wird durch Zugabe von 70 µl eines Neutralisierungspuffers (s. u.) beendet. Dabei werden verunreinigende chromosomale DNA und Proteine gefällt. Die Auftrennung erfolgt durch einen fünfminütigen Zentrifugationsschritt (5 min, 19000 x g, 4 °C).
- Der Überstand wird abgenommen und im gleichen Volumen Isopropanol gefällt.
- Nach einer Zentrifugation (5 min, 19000 x g, 4 °C) wird der Niederschlag mit 70%igem Ethanol gewaschen und abschließend nach Entfernen des Ethanols in 20-50 µl TE-Puffer oder ersatzweise A. bidest aufgenommen.

Resuspendierungspuffer:	25 mM TRIS/HCl (pH 7,9); 50 mM 40%ige Glucose; 10 mM EDTA/NaOH (pH 8,0) Für 100 ml: 2,5 ml 1 M TRIS/HCl (pH 7,9); 2,25 ml 40%ige Glucose; 2 ml 0,5 M EDTA/NaOH (pH 8,0); 93,25 ml steriles A. bidest
Lysepuffer:	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Neutralisierungspuffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5-8,0); 1 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5-8,0); 1 mM EDTA

2.5.2 Hochreine Bakterien Plasmid-Präparation durch Aufreinigung mit Silica-Säulen

Referenzen:

Sambrook *et al.*, 1989
Standard-Protokoll des Herstellers
(Macherey und Nagel)

Diese Art der Plasmid-Aufreinigung beruht auf dem Prinzip der spezifischen Bindung von Nucleinsäuren an Silica-Oberflächen und einer nachfolgenden Elution durch Niedrigsalzpuffer.

- Bis zu 3 ml einer dicht gewachsenen *E. coli* LB Kultur werden in einer Tischzentrifuge für 30 s bei 11000 x g sedimentiert.
- Der Zelniederschlag wird in 250 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Dabei sollte sich das Pellet vollständig auflösen.
- Durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer werden die Zellen aufgeschlossen. Der Ansatz wird durch sechs- bis achtmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes vorsichtig gemischt. Es folgt eine Inkubation von 3 bis maximal 5 min bei Raumtemperatur. (Die Lyse beruht auf dem gleichen Prinzip wie bei der in 2.5.1 beschriebenen Präparation.)
- Die Lyse wird durch Zugabe von 300 µl Neutralisierungspuffer gestoppt. Der Ansatz wird dafür erneut durch sechs- bis achtmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes durchmischt.
- Der Ansatz wird 5 min bei 11000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
- Das Säulen-Reaktionsgefäß wird in ein Auffang-Reaktionsgefäß eingesetzt.
- Der Überstand des Ansatzes wird auf die Säule gegeben. Der Ansatz wird erneut zentrifugiert (1 min, 11000 x g, RT). Die DNA bindet dabei an das Säulenmaterial. Der Durchlauf wird verworfen.
- Durch Zugabe von 450 µl Waschpuffer und anschließender Zentrifugation (4 min, 11000 x g, RT) wird die Membran gewaschen. Der Durchlauf wird erneut verworfen.
- Durch erneutes Zentrifugieren (4 min, 11000 x g, RT) der Säule werden Reste des Waschpuffers entfernt.
- Die Säule wird in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt.
- Nach der Zugabe von 50 µl Elutionspuffer wird der Ansatz 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (1 min, 11000 x g, RT).
- Der Durchlauf enthält das gereinigte Plasmid.

Durch Wiederholung des letzten Schrittes kann die Ausbeute um 15-20 % erhöht werden. Die Konzentration der Aufreinigung wird dadurch jedoch verringert. Zur Herstellung hochkonzentrierter Aufreinigungen werden lediglich 30 µl des Elutionspuffers eingesetzt. Die Zusammensetzung der einzelnen Puffer ist dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

2.5.3 DNA-Präparation aus Hefen

Referenzen:
Hoffman & Winston, 1987

Zur Präparation sowohl genomischer als auch plasmidaler DNA wurde folgendes Protokoll verwendet. Auf die wenigen Unterschiede im Ablauf, die sich aus der Art der aufzureinigenden Nucleinsäure ergeben, wird gesondert hingewiesen.

- Die Hefezellen werden über Nacht bei 28 °C in entsprechendem Selektionsmedium angezogen.
- Die Zellernte erfolgt bei einer Zelldichte von $\geq 10^7$ /ml. Dazu werden zunächst 1,5 ml der Hefesuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (!) überführt.
- Die Suspension wird in einer Tischzentrifuge sedimentiert (5 min, 2300 x g, RT). Nachdem der Überstand abgenommen und verworfen wurde, werden erneut 1,5 ml der Zellsuspension in das Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wird erneut sedimentiert. Der Überstand wird anschließend erneut abgenommen und verworfen.
- Der zurückgebliebene Niederschlag wird in 200 µl TSN-Lösung (s. u.) resuspendiert.
- Nach Zugabe von 200 µl eines Phenol-Chloroform Gemisches (1:1) und der Zugabe von etwa 0,3 g säuregewaschener Glasperlen werden die Zellen in einer Schwingmühle (z. B. FastPrep BIO 101) bei einer Geschwindigkeit von 4 m/s in 20 s aufgebrochen. Bei der Präparation plasmidaler DNA kann dieser Schritt zur Erhöhung der Ausbeute wiederholt werden.
- Nach der anschließenden, fünfminütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit wird der wässrige Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Bei der Präparation chromosomaler DNA wird die verbliebene organische Phase mit 200 µl TE-Lösung (pH 7,6) nachextrahiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wird die wässrige Phase mit der ersten vereint. Bei der Präparation plasmidaler DNA entfällt dieser Schritt.
- Zur Beseitigung möglicher RNA Kontaminationen werden der wässrigen Phase 20 µl RNase A (10 mg/ml) zugefügt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wird das Enzym bei 65 °C inaktiviert (Inkubationszeit: 5 min).
- Die Reinigung des Ansatzes erfolgt durch Zugabe von Phenol/Chloroform im gleichen Volumen wie dem des Ansatzes. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand enthält die DNA.

- Durch Zugabe des 2,5fachen Volumenanteils Ethanol abs. und einem zehntel Volumenanteil 3 M NaAc (pH 4,8) und anschließender Zentrifugation (5 min, 19000 x g, 4 °C) wird die DNA gefällt.
- Der Überstand wird abgenommen und der verbleibende Niederschlag durch Zugabe von 500 µl 70%igen Ethanols und anschließender Zentrifugation (5 min, 19000 x g, 4 °C) gewaschen.
- Abschließend wird der Ethanol restlos entfernt und der Niederschlag in 50 µl TE-Lösung aufgenommen.

TSN-Lösung:	2 % Triton X-100; 1 % SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris (pH 8,0); 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,5-8,0); 1 mM EDTA

2.6 Transformation von Bakterien und Hefen

2.6.1 Transformation von Bakterien

Referenzen:
Cohen *et al.*, 1973
Sambrook *et al.*, 1989

2.6.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen

- Zellen aus einer Kryokultur werden auf einer LB-Agar Platte mit 12,5 µl/ml Tetracyclin ausgestrichen.
- Die Zellen werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.
- 125 ml SOB-Medium (+20 mM Mg²⁺, s. u.) werden mit einem Inokulum von 5-6 Kolonien angeimpft.
- Die Bakterien werden bei 22-25 °C auf einem Schüttler (225 U/min) über Nacht inkubiert.
- Zur Überprüfung der Zelldichte wird die Trübung der Kultur in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen SOB-Medium bestimmt.
- Erreicht die Zelldichte (OD₆₀₀) Werte von 0,45-0,6 werden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt.
- Die Kultur wird in 50 ml Schraubdeckelgefäße überführt und in einer Zentrifuge sedimentiert (10 min, 2500 g, 4 °C).
- Der Überstand wird verworfen. Die sedimentierten Zellen werden in 20 ml eisgekühltem TB-Puffer (s. u.) aufgenommen.
- Die Zellen werden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut sedimentiert (10 min, 2500 g, 4 °C).
- Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet in 10 ml eisgekühltem TB-Puffer aufgenommen. Die Suspension wird mit 750 µl DMSO versetzt (Die Finalkonzentration liegt bei 7 %).
- Die Zellen werden 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden Portionen zu 200 µl respektive 400 µl angefertigt, die unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.
- Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

SOB-Medium:	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 mM KCl; pH 7,0 mit NaOH; autoklavieren
TB-Puffer:	10 mM Pipes; 15 mM CaCl ₂ ; 250 mM KCl; pH 6,7 mit KOH; 55 mM MnCl ₂ ; steril filtrieren (0,22 µm)
2 M Mg²⁺ (Stock):	10,1 g MgCl x 6 H ₂ O; 12,3 g MgSO ₄ ad 50 ml; sterilfiltrieren (0,22 µm)
XL-Blue Genotyp:	<i>F'proAB lac^gD(lacZ)M15 Tn10(Tet^r) / recA1 endA1 gyrA96(Naf^r) thi hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 relA1 lac</i>

2.6.1.2 Transformation der kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA

- Die nach Arbeitsvorschrift 2.6.1.1 hergestellten kompetenten Zellen werden schonend auf Eis aufgetaut.
- Zu 100 µl der kompetenten Zellen wird Plasmid-DNA gegeben (10-100 ng) und der Transformationsansatz anschließend für 10-30 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. Danach werden die Zellen erneut auf Eis abgekühlt (5 min).
- Der Transformationsansatz (etwa 100 µl) wird vollständig auf vorgewärmten LB-Agar Selektionsplatten ausplattiert.
- Die ausplattierten Zellen werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Selektionen erfolgten auf das Antibiotikum Ampicillin in einer Finalkonzentration von 0,1 mg/ml.

Für anspruchsvolle Anwendungen kann den Zellen vor Zugabe der Plasmid-DNA β-Mercaptoethanol in einer Finalkonzentration von 25 mM (1,7 µl einer 1,42 M Stocklösung) zur Steigerung der Transformationseffizienz zugegeben werden.

2.6.2 Transformation von Hefen mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode

Referenzen:
Zhao *et al.*, 1993

2.6.2.1 Herstellung und Lagerung von kompetenten Hefezellen

- 50 ml einer logarithmisch wachsenden Flüssigkultur werden in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß überführt und in einer Zentrifuge (5 min, 2300 x g, RT) sedimentiert.
- Der Überstand wird verworfen und die verbliebenen Zellen in 10 ml 1 x TE-Puffer (s. u.) gewaschen. Die resuspendierten Zellen werden anschließend erneut sedimentiert (5 min, 2300 x g, RT).
- Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 5 ml Lithiumacetatpuffer (s. u.) aufgenommen. Die Zellen werden dann 1 h bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert.
- Nachdem die Zellen erneut sedimentiert worden sind (5 min, 2300 x g, RT) werden sie in 5 ml Lithiumacetatpuffer + 10 % Glycerin (s. u.) resuspendiert.
- Es werden Aliquote zu je 100 µl angefertigt.

Die so hergestellten kompetenten Zellen können bei -80 °C für bis zu 6 Monate gelagert werden. Ältere Zellen zeichnen sich durch eine stark abnehmende Transformationsrate aus und sollten schnellstmöglich ersetzt werden.

Stocklösungen

10 x TE Puffer I:	100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA
10 x TE Puffer II:	100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA
10 x Lithiumacetat Stocklg.:	1 M Lithiumacetat, pH 7,5

Gebrauchslösungen

1 x TE Puffer :	1 ml 10 x TE Puffer I; 9 ml steriles A. bidest
Lithiumacetat Puffer:	0,5 ml 10 x TE Puffer II; 0,5 ml 10 x Lithiumacetat; 4 ml steriles A. bidest
Lithiumacetat Puffer + 10 % Glycerin:	wie oben + 0,5 ml Glycerin 87 % aber nur 3,5 ml steriles A. bidest

2.6.2.2 Transformation der Zellen

- Die in 2.6.2.1 hergestellten Zellen werden bei Raumtemperatur aufgetaut.
- Gleichzeitig wird Heringssperma (0,5 µg/µl) 10 min bei 80 °C denaturiert. Das Heringssperma fungiert als so genannte *Carrier*-DNA, die die Aufnahme der Plasmid-DNA begünstigt.
- Zu der aufgetauten Zellsuspension werden 1 µg* Plasmid-DNA, 5 µl EtOH abs. und 2 µl Heringssperma gegeben. Ethanol erhöht die Transformationsrate bei Hefen bis auf das 15fache (Lauermann, 1991).
- Der Ansatz wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Anschließend werden 250 µl einer PEG 4000 Lösung (s. u.) zugegeben.
- Der Transformationsansatz wird auf einem Rotationsschüttler bei 30 °C für 1 h inkubiert.
- Anschließend erfolgt ein Hitzeschock bei 46 °C für exakt 15 min.
- Die Zellen werden langsam (5-10 min) auf Raumtemperatur (!) abgekühlt.
- Der Transformationsansatz wird anschließend auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen.
- Die Platten werden solange bei 30 °C inkubiert, bis sich Transformanten zeigen.

* entspricht etwa 5 µl einer Minipräparation durch alkalische Lyse (s. 2.5.1) oder etwa 10 µl einer hochreinen Säulenpräparation (s. 2.5.2).

50 % (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 4000

5 g PEG in 10 ml A. bidest aufnehmen und steril filtrieren

2.7 Lagerung von Hefen

2.7.1 Herstellung von Kryokulturen

Die langfristige Aufbewahrung der verwendeten Hefestämme erfolgte im gefrorenen Zustand bei einer Lagerungstemperatur von -80 °C. Dieses Vorgehen garantiert eine hohe genetische Stabilität der Zellen und eine Beibehaltung der phänotypischen Merkmale z. T. über mehrere Jahre hinweg. Um eine mechanische Schädigung der Zellen durch Ausbildung von Eiskristallen zu vermeiden, wurde Glycerin als Schutzstoff eingesetzt. Diese Substanz dringt leicht in die Zellen ein. In der Zelle stabilisiert Glycerin die Hydrathüllen von zelleigenen Proteinen und verhindert die Denaturierung dieser Proteine und darüber hinaus einen Anstieg der Elektrolytkonzentration. Die Ausbildung von Eiskristallen wird deutlich verlangsamt.

Zur Herstellung der Kryokulturen werden von einer nicht zu dicht gewachsenen Übernachtskultur Teilmengen zu je 1000 µl entnommen und in 1,5 ml Schraubdeckelreaktionsgefäße überführt. Die Zahl der überführten Aliquote entspricht der späteren Zahl der hergestellten Glycerinkulturen. Die Zellen werden anschließend durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge sedimentiert (5 min, 1100 x g, RT). Nach der Zentrifugation wird die Hälfte (500 µl) des Überstandes abgenommen und verworfen. Die Zellen werden in dem verbleibenden Überstand resuspendiert. Das entnommene Volumen wird daraufhin durch das gleiche Volumen Glycerin (87 % vol, steril) ersetzt. Zellsuspension und Glycerin werden sorgfältig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die hergestellten Glycerinkulturen können nun bei -80 °C gelagert werden. Kryokulturen sind bei Überschreiten der empfohlenen Lagerdauer von einem Jahr zu überprüfen und gegebenenfalls durch neu hergestellte zu ersetzen.

2.8 Modifikationen von DNA

2.8.1 Restriktionsspaltung

Referenzen:

Nathans *et al.*, 1975
 Feinberg & Vogelstein, 1983
 Hanahan, 1989
 Sambrook *et al.*, 1989
 Kessler & Manta, 1990

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Restriktionsspaltungen erfolgten unter Verwendung von Restriktionsenzymen der Firma MBI Fermentas.

Restriktionsenzyme werden aus Bakterien isoliert, die diese zum Schutz vor Viren durch Degradierung (Hydrolyse) der viralen DNA einsetzen. Die Bezeichnung der Nucleasen leitet sich von dem Organismus ab, aus dem sie (ursprünglich) isoliert wurden (z. B. *Pst* I aus *Providencia stuartii*). Im Labor kommen meist Restriktionsenzyme vom Typ-II zum Einsatz. Ein solches Typ-II-System findet man in etwa einem von drei Bakterienstämmen. Die Erkennungsstellen für Typ-II-Enzyme sind häufig Palindrome von vier bis sechs, seltener von acht Basenpaaren. Die Spaltungsstelle ist identisch mit oder nahe bei der Erkennungsstelle. Die Sequenzen sind, sofern sie im Genom des Bakteriums selbst vorkommen, durch Methylierung an einem Adenin- oder Cytosinrest vor der hydrolytischen Spaltung geschützt. Fremde DNA ist an diesen Stellen für gewöhnlich nicht methyliert und wird von den Nucleasen gespalten. Bei Restriktionsenzymen wird eine Enzymeinheit (1 u) als die Aktivität der Enzymmenge definiert, welche benötigt wird, 1 µg einer DNA-Kontrollsequenz in einem Ansatz mit einem Volumen von 50 µl bei optimaler Temperatur innerhalb von einer Stunde vollständig zu spalten. Auf welche DNA-Kontrollsequenz sich die Angabe im Einzelnen bezieht, ist den jeweiligen Herstellerangaben zu entnehmen. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um λ-DNA.

Die für den Restriktionsansatz benötigte Enzymmenge (Anzahl der Units) richtet sich sowohl nach der Länge des zu spaltenden Fragmentes als auch nach der Anzahl der in diesem Fragment vorliegenden Schnittstellen und wird mit folgender Gleichung ermittelt:

$$U = \frac{\text{Länge der zu spaltenden DNA-Sequenz}}{\text{Länge der DNA-Kontrollsequenz}} \times \frac{\text{Anzahl der Schnittstellen* in der DNA-Kontrollsequenz}}{\text{Anzahl der Schnittstellen* in zu spaltender DNA-Sequenz}}$$

* Anzahl der Schnittstellen des verwendeten Restriktionsenzymes, nicht die Gesamtzahl aller Schnittstellen!

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Spaltungen wurde im allgemeinen die doppelte der theoretisch benötigten Enzymmenge eingesetzt. Dabei ist bei einigen Restriktionsenzymen zwingend darauf zu achten, dass die finale Menge an Glycerin (Aufbewahrung der Enzyme erfolgt in Glycerin) im Restriktionsansatz bestimmte Konzentrationen nicht überschreitet, da diese Enzyme andernfalls ihre Aktivität einbüßen. Diese Informationen sind den Herstellerangaben im Vorfeld zu entnehmen. Abhängig von der Art der Aufreinigung der zu spaltenden DNA ist dem Restriktionsansatz RNase A in einer Finalkonzentration von 0,2 µg/µl zuzugeben. Sofern der verwendete 10x Reaktionspuffer kein Rinderserumalbumin (BSA) enthält, ist dieses zum Schutz des Restriktionsenzymes vor einem proteolytischen Abbau durch vorhandene Proteasen separat hinzuzugeben.

Die Inkubationszeit des Restriktionsansatzes variiert in Abhängigkeit von der verwendeten Nuclease zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden. Die einzustellende Inkubationstemperatur hängt ebenfalls von der verwendeten Nuclease ab und ist den Herstellerangaben zu entnehmen. Für die spätere Herstellung chimärer DNA ist die Erzeugung kohäsiver Enden der von glatten Enden unbedingt zu bevorzugen. Ein mit Hilfe von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (von denen zumindest eines kohäsive Enden erzeugt) generiertes Fragment lässt sich gerichtet in einen entsprechend geschnittenen Vektor ligieren. Bei glatten Enden sind stets zwei Orientierungen des Fragmentes im Vektor möglich.

2.8.2 Glätten kohäsiver Enden von DNA-Fragmenten

Referenzen:
Clark, 1988
Sambrook *et al.*, 1989
Ausubel *et al.*, 2001

Einige Restriktionsenzyme wie z. B. *Hpa* I erzeugen glatte Enden. DNA-Fragmente mit glatten Enden (auch wenn diese von unterschiedlichen Restriktionsenzymen generiert worden sind) lassen sich ohne weiteres miteinander ligieren. Viele Restriktionsenzyme erzeugen jedoch versetzte Schnitte, wodurch an den Enden Überhänge einzelsträngiger DNA entstehen. Derartige Enden werden als kohäsive Enden bezeichnet. Solange kohäsive Enden zweier DNA-Fragmente mit dem gleichen Restriktionsenzym oder mit Nucleasen, die identische Enden hervorbringen, erzeugt worden sind, ist deren Ligation absolut problemlos. Unterscheiden sich die kohäsiven Enden jedoch voneinander, ist eine Ligation nicht ohne weitere Modifikation der Überhänge möglich. Um auch derartige Fragmente miteinander ligieren zu können, müssen zunächst die überstehenden Enden geglättet werden. Das heißt, die kohäsiven Enden werden in glatte Enden umgewandelt. Für derartige Reaktionen wurde die T4 DNA-Polymerase der Firma *MBI Fermentas* verwendet. Dabei handelt es sich um eine DNA abhängige DNA-Polymerase, die bei Vorhandensein von Desoxyribonucleotiden und

eines Primers die 5'→3' Synthese an einzelsträngiger DNA als Matrize katalysiert. Das Enzym verfügt über eine 3'→5' Exonuclease Aktivität, jedoch nicht über eine 5'→3' Exonuclease Aktivität. Ursprünglich stammt dieses Enzym aus dem Bakteriophagen T4. Es wird heute jedoch vorwiegend mit Hilfe gentechnisch manipulierter *E. coli* Bakterien gewonnen.

Folgendes Protokoll zum Glätten kohäsiver Enden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase wird von Seiten des Herstellers empfohlen:

1. Herstellen des Reaktionsansatzes:

gespaltene DNA	1 µg
5x Reaktionspuffer (s. u.)	4 µl
2 mM dNTP Mix	1 µl
T4 DNA-Polymerase	1 u
Wasser (nucleasefrei)	ad 20 µl

2. Inkubation des Reaktionsansatzes für 20 min bei 11 °C oder alternativ für 5 min bei Raumtemperatur.
3. Abbruch der Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf 70 °C für 10 min.

Zur weiteren Nutzung für die anschließende Ligationsreaktion wird der Ansatz durch Zugabe von 20 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) und anschließender Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit extrahiert. Der Überstand wird entnommen und die in ihm enthaltene DNA durch Zugabe des 2,5fachen Volumens Ethanol abs. und eines zehntel Volumens 3 M NaAc (pH 4,8) während der anschließenden Zentrifugation (5 min, 20000 x g, 4 °C) gefällt. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Der verbleibende Niederschlag (DNA) wird in 70%igem Ethanol gewaschen. Dieser wird nach erneuter Zentrifugation vollständig entfernt. Der Niederschlag wird in der gewünschten Menge A. bidest aufgenommen und kann nun zur Ligation verwendet werden.

5x Reaktionspuffer: 335 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25 °C), 33 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 84 mM (NH₄)₂SO₄.

2.8.3 Dephosphorylierung der 5'-Enden linearer DNA-Fragmente

Referenzen:
Sambrook *et al.*, 1989

Mit einem einzelnen Restriktionsenzym oder mit komplementäre Enden erzeugenden Nucleasen linearisierte Klonierungsvektoren neigen stark zur Wiederverknüpfung, ohne dass ein Fragment eingefügt wird. Um derartige Wiederverknüpfungen zu vermeiden und somit die Effizienz der DNA Insert Ligation (s. 2.8.4) zu erhöhen, müssen in einem solchen Falle die 5'-Enden der linearisierten Vektoren zunächst dephosphoryliert werden. Für derartige Modifikationen wurde eine Shrimps Alkaline Phosphatase (SAP) der Firma *MBI Fermentas* verwendet.

Für die Dephosphorylierung freier 5'-Enden mit der Shrimps Alkalinen Phosphatase wird seitens des Herstellers folgendes Protokoll empfohlen:

1. Lösen von 1-10 pmol freier DNA-Enden in 10-40 µl nucleasefreiem Wasser
2. Herstellen des Reaktionsansatzes:

gelöste DNA	10-40 µl
10x Reaktionspuffer	5 µl
Wasser (nucleasefrei)	ad 49 µl
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 u)	1 µl

3. Inkubation des Reaktionsansatzes für 30 min bei 37 °C.
4. Abbruch der Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C für 15 min.

Zur weiteren Nutzung für die anschließende Ligationsreaktion wird der Ansatz durch Zugabe von 50 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) und anschließender Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit extrahiert. Der Überstand wird entnommen und die in ihm enthaltene DNA durch Zugabe des 2,5fachen Volumens Ethanol abs. und eines zehntel Volumens 3 M NaAc (pH 4,8) während der anschließenden Zentrifugation (5 min, 20000 x g, 4 °C) gefällt. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Der verbleibende Niederschlag (DNA) wird in 70%igem Ethanol gewaschen. Dieser wird nach erneuter Zentrifugation vollständig entfernt. Der Niederschlag wird in der gewünschten Menge A. bidest aufgenommen und kann nun zur Ligation verwendet werden.

2.8.4 DNA Insert Ligation in Vektor-DNA

Referenzen:

Cohen *et al.*, 1973
Cohen, 1975
Engler *et al.*, 1982
Sambrook *et al.*, 1989
Rossi *et al.*, 1997
Ausubel *et al.*, 2001

Zur Verknüpfung eines DNA-Fragmentes mit einem Klonierungsvektor ist eine Reaktion zwischen den Enden des Fragmentes einerseits und den Enden des Vektors andererseits erforderlich. Komplementäre Enden lagern sich durch Basenpaarung aneinander. Dem so entstehenden chimären Plasmid fehlen nun lediglich die kovalenten Phosphodiester-Bindungen zwischen den aneinander gelegten 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyl Termini. Diese werden durch DNA-Ligasen hergestellt. DNA-Ligasen ermöglichen darüber hinaus auch die Verknüpfung freier glatter Enden. Im für die Reaktion erforderlichen Ansatz sollte die Konzentration der freien Enden des Inserts mindestens dreimal so hoch sein wie die der freien Enden des Klonierungsvektors. Zur Konzentrationsbestimmung können die zu verknüpfenden Fragmente (jeweils nur eine Teilmenge) zunächst auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden (s. 2.9.1). Die Konzentrationen lassen sich dann anhand der Bandenstärken abschätzen. Handelt es sich bei den zu ligierenden Fragmenten um nicht aufgereinigtes Geleluat ist die Konzentrationsabschätzung anhand der Stärken der eluierten Banden vorzunehmen. Sämtliche Ligationsreaktionen wurden mit der T4 DNA-Ligase der Firma *MBI Fermentas* durchgeführt. Ursprünglich aus dem T4 Bakteriophagen isoliert wird das Enzym heute gentechnisch aus *E. coli* Zellen gewonnen, die das Gen 30 des Phagen tragen.

Für die DNA Insert Ligation mit Hilfe der T4 DNA-Ligase empfiehlt der Hersteller die Verwendung des folgenden Protokolls:

1. In einem Reaktionsgefäß werden 5-10 µl einer Mischung aus gespaltener Vektor-DNA (50-400 ng) und des zu ligierenden Inserts in (nucleasefreiem) Wasser oder TE-Puffer vorgelegt.
2. Dem Ansatz sind hinzu zu geben:

10x Ligationspuffer	2 µl
50%ige PEG 4000 Lösung (nur bei glatten Enden)	2 µl
T4 DNA-Ligase	1-2 u (kohäsive Enden)
	5 u (glatte Enden)
Wasser (nucleasefrei)	ad 20 µl

3. Durchmischen des Reaktionsansatzes durch intensives Schütteln. Anschließend kurze Zentrifugation (3-5 s) in einer Tischzentrifuge.
4. Inkubation des Ligationsansatzes bei 22 °C für eine Stunde.
5. Inaktivierung der T4 DNA-Ligase durch Erhitzen des Ligationsansatzes auf 65 °C für 10 min.
6. Der Ansatz kann direkt zur Transformation in kompetente *E. coli* Zellen verwendet werden (s. 2.6.1.2).

Zur Steigerung des Ertrages an Ligationsprodukten kann die Inkubationszeit erhöht werden (über Nacht).

Die Zugabe von Polyethylenglycol (PEG) zum Reaktionsansatz erhöht die Ligationsrate freier glatter DNA-Enden. Die empfohlene Finalkonzentration an PEG 4000 im Ansatz liegt bei 5 % (w/v).

10x Ligationspuffer	400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7,8 bei 25 °C)
TE Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,8)
50 % PEG 4000 Lösung	50 % (w/v) Polyethylen Glycol 4000

2.9 Analyse von DNA

2.9.1 DNA-Gelelektrophorese

Referenzen:

Aaij & Borst, 1972
 Sharp *et al.*, 1973
 Helling *et al.*, 1974
 Southern, 1979
 Andrews, 1986
 Sambrook *et al.*, 1989

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich DNA Moleküle unterschiedlicher Größe auftrennen. Aufgrund der einfach negativen Ladung von DNA Molekülen wandern diese in einem angelegten Spannungsfeld in Richtung Anode. Die Geschwindigkeit, mit der die aufzutrennenden Fragmente durch ein Elektrophorese-Gel wandern, nimmt dabei mit zunehmender Größe der Fragmente ab. Die Auftrennung von DNA Molekülen erfolgte stets unter Verwendung von 1x TAE Agarose-Gelen. Bei Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid, welches aus einer marinen Alge isoliert wird. Als Gel bildet Agarose mittelgroße Poren aus, die eine Auftrennung von DNA Molekülen einer Größe zwischen 300 und 10000 Nucleotiden erlaubt. Dabei wird die Agarosekonzentration der Größe der aufzutrennenden Fragmente angepasst. Bei Fragmenten von mehr als 2 kb wird eine Agarosekonzentration von 0,8 % (m/v) gewählt. Kleine Fragmente mit weniger als 0,5 kb werden mit Hilfe von 2%igen (m/v) Gelen aufgetrennt. Zur spezifischen Anfärbung der Nucleinsäurefragmente wurde den Gelen 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt (s. 2.4.1). Die aufzutrennenden Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/6 Volumen eines 6x Ladepuffers (s. u.) versetzt. Der Ladepuffer erleichtert einerseits das Auftragen (durch das Glycerin sinkt die Probe beim Pipettieren ab) und andererseits ermöglicht er durch den/die zugesetzten Farbstoff(e) eine Überwachung des Voranschreitens der Auftrennung (Farbstoff wandert im angelegten Spannungsfeld). Die Höhe der anzulegenden Spannung richtet sich nach dem Abstand der Elektroden zueinander. Sie wird auf 5-6 V pro Zentimeter Elektrodenabstand eingestellt.

50x TAE-Puffer

6x Ladepuffer

2 M Tris-Acetat (pH 7,0), 50 mM EDTA

z. B. 6x TAE-Puffer, 50 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylen Cyanol, 50 mM EDTA, 1 % SDS

50 % (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 4000

5 g PEG in 10 ml A. bidest aufnehmen und steril filtrieren

2.9.2 Gelelution von DNA-Fragmenten aus Agarose Gelen

Referenzen:
Hengen, 1996

Zur weiteren Bearbeitung der DNA nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung muss diese von Gelbestandteilen befreit werden. Mit Hilfe des Verfahrens der Gelelution können einzelne DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen isoliert werden. Dazu wird zunächst der Boden eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes mit Hilfe einer Kanüle durchstoßen. Unter Verwendung von mit Ethanol gereinigten Pinzetten (EtOH 70 %, zur Vermeidung einer Kontamination mit Fremd-DNA) wird das Gefäß zur Hälfte mit salinisierte Glaswolle (*Serva*) befüllt, wobei die Wolle leicht angedrückt wird. Das so vorbereitete Reaktionsgefäß wird anschließend in ein geöffnetes 1,5 ml Reaktionsgefäß (Auffanggefäß) gesteckt. Das zu eluierende Fragment wird aus dem Gel herausgeschnitten. Auch hier sind sämtliche Werkzeuge wie Pinzetten und Skalpell sowie die Arbeitsfläche zunächst mit 70%igem Ethanol zu behandeln. Beim Herausschneiden ist eine übermäßig starke und lange UV-Bestrahlung unbedingt durch entsprechende Schutzmaßnahmen und zügiges Arbeiten zu vermeiden. Andernfalls besteht die Möglichkeit, dass die zu eluierende DNA Schaden nimmt. Das herausgeschnittene Gelfragment wird in das 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch die anschließende Zentrifugation (5 min, 20000 x g, 4 °C) gelangt die in TAE gelöste DNA in das Auffanggefäß. Gelpartikel werden dabei von der Glaswolle zurückgehalten. Das Geleluat kann nun direkt für die Ligationreaktion (s. 2.8.4) verwendet werden. Dabei ist darauf zu achten, dass im Kontrollansatz (Ligationsansatz ohne Insert) die gleiche TAE-Konzentration wie im eigentlichen Ligationsansatz eingestellt wird. Sollen die Geleluate über einen etwas längeren Zeitraum zur Verfügung stehen oder sollen weitere Modifikationen an der DNA vorgenommen werden, empfiehlt es sich, die DNA durch Zugabe des gleichen Volumens eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) und anschließender Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zu extrahieren. Der Überstand wird anschließend abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die in ihm enthaltene DNA wird durch Zugabe des 2,5fachen Volumens Ethanol abs. und eines zehntel Volumens 3 M NaAc (pH 4,8) während der anschließenden Zentrifugation (5 min, 20000 x g, 4 °C) gefällt. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Der verbleibende Niederschlag (DNA) wird in 70%igem Ethanol gewaschen. Dieser wird nach erneuter Zentrifugation vollständig entfernt. Der Niederschlag wird in der gewünschten Menge A. bidest aufgenommen und steht für die weitere Bearbeitung oder für eine Lagerung bei -20 °C zur Verfügung.

2.9.3 DNA-Sequenzanalyse

Referenzen:
Sanger *et al.*, 1977

Heutzutage wird zur DNA-Sequenzanalyse vorwiegend die enzymatische Sequenzierungsmethode nach Sanger *et al.* (1977) verwendet. Bei diesem Verfahren dient die zu sequenzierende DNA als Matrize für eine *in vitro* Polymerisierungsreaktion durch eine DNA-Polymerase. Dafür werden vier getrennte Reaktionsmischungen angesetzt, die jeweils alle vier Substratnucleotide sowie ein DNA synthetisierendes Enzym enthalten. Darüber hinaus wird den vier Ansätzen eine geringe Menge eines Didesoxyanalogos jeweils eines anderen Nucleotidvorläufers hinzugegeben. Diesen fehlt die 3'-OH-Gruppe. Kommt es in den Ansätzen zu dem Einbau eines solchen Didesoxynucleotides in die wachsende Nucleinsäurekette, folgt der Abbruch der Polymerisierungsreaktion. Da der Einbau der Didesoxynucleotide selten und zufällig erfolgt, entstehen in einem Ansatz DNA-Abschnitte unterschiedlicher Länge, die allesamt mit der gleichen Base enden. Es werden vier getrennte Reaktionen durchgeführt, eine für jede Base. Die Produkte werden durch Gelelektrophorese in separaten Bahnen aufgetrennt. Die DNA-Sequenz erhält man, indem man von einer Bande zu der um ein Base längeren voranschreitet.

Die während dieser Arbeit angefallenen DNA-Sequenzanalysen wurden an externe Dienstleister abgegeben.

2.9.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Referenzen:
Chien *et al.*, 1976
Saiki *et al.*, 1985
Mullis *et al.*, 1986
Mullis & Faloona, 1987
Saiki *et al.*, 1988
Sambrook *et al.*, 1989
White *et al.*, 1989
Innis *et al.*, 1989

Die Verfügbarkeit von isolierten DNA-Polymerasen und von auf chemischem Wege synthetisierten DNA-Oligonucleotiden ermöglichte erstmals die Herstellung spezifischer DNA-Sequenzen außerhalb lebender Zellen. Die als Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bekannte Technik ermöglicht die Amplifikation von mehr als 10 Millionen Kopien einer DNA-Sequenz ausgehend von lediglich einigen wenigen Molekülen. Dieses Verfahren setzt dabei jedoch voraus, dass zumindest die Sequenzen an den Randbereichen der zu amplifizierenden Zielsequenz bekannt sind. Aufgrund ihrer hohen Temperaturstabilität wird bei dieser Technik die Taq DNA-Polymerase als DNA-synthetisierendes Enzym verwendet. Sie übersteht Tempera-

turen von 95 °C über einen Zeitraum von mehr als 40 min. Bei der *Taq* DNA-Polymerase handelt es sich um ein Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Sie katalysiert die 5'→3' DNA-Synthese, verfügt jedoch über keine nachweisbaren 3'→5' Korrekturlese-Eigenschaften. Eine Enzyeinheit (1 u) wird definiert als die Enzymmenge, die den Einbau von 10 Nanomol Desoxyribonucleotiden an ein Polynucleotidbruchstück (adsorbiert an DE-81) in 30 min bei 70 °C katalysiert. Für sämtliche PCRs wurde *Taq* DNA-Polymerase der Firma *MBI Fermentas* verwendet.

Hinweise: Die zu verwendenden Reaktionsgefäße sind zunächst durch UV-Licht Bestrahlung von möglicherweise vorhandenen DNA-Kontaminationen zu befreien.

Bei DNA-Aufreinigungen für eine spätere PCR und bei der Herstellung von PCR-Reaktionsansätzen sollten jeweils ungebrauchte Schutzhandschuhe verwendet werden.

Um Kontaminationen durch Fremd-DNA ausschließen zu können, sollte stets zusätzlich zu den PCR-Ansätzen ein Kontrollansatz ohne die Zielsequenz angefertigt werden.

Für die Anfertigung eines PCR-Ansatzes empfiehlt der Hersteller folgendes Protokoll:

1. Nach dem Auftauen werden sämtliche Lösungen sanft aufgewirbelt und kurz abzentrifugiert.
2. In ein auf Eis stehendes, dünnwandiges PCR-Gefäß werden die folgenden Bestandteile gegeben:

Reagenz	Volumen	Finalkonzentration
A. bidest, steril	ad 50 µl	-
10x <i>Taq</i> Puffer	5 µl	1x
2 mM dNTP-Lösung	5 µl	je 0,2 mM
Universal UP Primer 100 µM	0,05-0,5 µl	0,1-1 µM
Universal RP Primer 100 µM	0,05-0,5 µl	0,1-1 µM
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	variabel	1,25 u
25 mM MgCl ₂	2-8 µl	1-4 mM
Zielsequenz	variabel	10 pg- 1µg

Bei abweichenden Volumina der PCR-Ansätze sind die oben stehenden Angaben entsprechend anzupassen.

3. Die Reaktionsansätze werden vorsichtig durchmischt und anschließend kurz zentrifugiert, um Tropfenbildung an der Gefäßwand zu vermeiden.
4. Die Proben werden in einen Thermocycler gestellt und das entsprechende PCR-Programm wird gestartet (s. u.).

Anmerkungen zu den Bestandteilen eines PCR-Ansatzes:

Zielsequenz

Üblicherweise liegt die Menge an DNA in einem 50 µl Ansatz bei 0,01-1 ng bei Plasmid-DNA und bei 0,1-1 µg bei genomischer DNA. Höhere Ausgangsmengen der Zielsequenz erhöhen für gewöhnlich den Anteil unspezifischer PCR-Produkte.

MgCl₂

MgCl₂ ist ein essentieller Co-Faktor der *Taq* DNA-Polymerase. Da Mg²⁺ Ionen Komplexe mit dNTPs und Primern sowie der Zielsequenz bilden können, muss die optimale MgCl₂-Konzentration für jedes Experiment separat ermittelt werden. Durch eine zu geringe Konzentration an Mg²⁺ Ionen wird die Effizienz der Primeranlagerung reduziert und die Syntheseleistung herabgesetzt. Beides resultiert in einer geringeren Ausbeute an PCR-Produkten. Zu hohe Konzentrationen indes fördern die Amplifikation unspezifischer Fragmente (erkennbar an einer Schmierbildung bei der elektrophoretischen Untersuchung) und fördern den Einbau falscher Nucleotide. Die empfohlene MgCl₂-Konzentration bei Standard-PCR-Anwendungen liegt zwischen 1 und 4 mM. Enthält die DNA-Aufreinigung jedoch EDTA oder andere Chelatbildner ist die MgCl₂-Konzentration entsprechend zu erhöhen.

Taq DNA-Polymerase

Normalerweise werden 1-1,5 u *Taq* DNA-Polymerase in einem 50 µl Ansatz eingesetzt. Höhere Konzentrationen können eine erhöhte Synthese unspezifischer Produkte verursachen. Zu niedrige Konzentrationen reduzieren die Effizienz. In der DNA-Aufreinigung möglicherweise vorhandene Inhibitoren der *Taq* DNA-Polymerase (z. B. Phenolreste) machen eventuell höhere Mengen des Enzyms von 2-3 u notwendig.

dNTPs

Die Finalkonzentration jedes dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) im Reaktionsansatz liegt üblicherweise bei 0,2 mM. Höhere Konzentrationen führen zu einem verstärkten Fehleinbau. Alle Nucleotide sind exakt in der gleichen Konzentration einzusetzen. Weicht die Konzentration eines dNTPs von der Konzentration der anderen ab, führt dies zu einer drastisch erhöhten Fehlerrate. Eine Ausnahme bilden modifizierte Nucleotide, die in höherer Konzentration einzusetzen sind.

Primer

Die Länge der Primer liegt üblicherweise zwischen 15 und 30 Nucleotiden. Die Spezifität steigt dabei mit zunehmender Länge. Der GC-Gehalt der Primer sollte bei 40-60 % liegen. Diese beiden Nucleotide sollten dabei gleichmäßig über die Länge des Primers verteilt sein. Wird der Primer am 3'-Ende durch ein G oder ein C abgeschlossen, wird die Anbindung an die Zielsequenz deutlich verbessert. Dabei sollten jedoch mehr als drei G oder C am 3'-Ende vermieden werden, da dies die Spezifität der Primeranlagerung herabsetzt. Die Primer sind so abzuleiten, dass die Ausbildung von z. B. Haarnadelstrukturen vermieden wird. Die Primer eines Reaktionsansatzes sollten darüber hinaus nicht komplementär zueinander sein, da es sonst zu einer verstärkten Bildung von Primerdimeren kommen kann. Die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer sollten nicht mehr als 5 °C voneinander abweichen.

Die Amplifikationsbedingungen hängen stark von der Beschaffenheit der Zielsequenz und der verwendeten Primer ab. Die folgende Darstellung gibt eine Übersicht über die einzelnen Schritte einer allgemeinen PCR-Amplifikation. Länge und evtl. Temperatur der einzelnen Schritte sind den jeweiligen Voraussetzungen anzupassen (s. u.).

	Dauer	Temperatur
<i>Initiale Denaturierung</i>	1-10 min	95 °C
25-40 Zyklen	<i>Denaturierung</i>	0,5-4 min
	<i>Primer-Hybridisierung</i>	0,5-2 min
	<i>Synthese</i>	1-3 min
	<i>Finale Strangsynthese</i>	5-15 min
		72 °C

Anmerkungen zu den Amplifikationsbedingungen:

Initiale Denaturierung

Die vollständige Denaturierung der DNA zu Beginn der PCR ist von großer Bedeutung. Eine unvollständige Denaturierung führt zu einer ineffizienten Nutzung des Ausgangsmaterials und so zu einer geringen Ausbeute an PCR-Produkten. Die Dauer dieses Reaktionsschrittes hängt in starkem Maße vom GC-Gehalt des Ausgangsmaterials ab. Bei Material mit einem GC-Gehalt von bis zu 50 % reichen 1-3 min bei 95 °C für eine initiale Denaturierung völlig aus. Mit zunehmendem GC-Gehalt sollte die Dauer dieses Schrittes jedoch auf bis zu 10 min erhöht werden. Allerdings sollte in diesem Falle die Zugabe der *Taq* DNA-Polymerase erst nach der initialen Denaturierung erfolgen.

Denaturierung

Für gewöhnlich sind für diesen Schritt 0,5-2 min bei 94-95 °C ausreichend, da das synthetisierte PCR-Produkt deutlich kürzer ist als das Ausgangsmaterial. Weist das zu amplifizierende Produkt einen hohen GC-Gehalt auf, kann die Dauer dieses Schrittes auf 3-4 min erhöht werden.

Primer-Hybridisierung

Dauer sowie Temperatur dieses Reaktionsschrittes sind abhängig von der Konzentration, der Länge und der Zusammensetzung der verwendeten Primer. Normalerweise liegt die optimale Hybridisierungstemperatur 5 °C unter der Schmelztemperatur des Primer-Matrizen-DNA-Duplex. Für Primer mit einer Länge von bis zu 25 Nucleotiden kann die ungefähre Schmelztemperatur mit folgender Faustformel abgeschätzt werden:

$$T_m = 4 * (G+C) + 2 * (A+T)$$

Zur Berechnung von Schmelztemperaturen für Primer mit einer Länge von mehr als 25 Nucleotiden sollten geeignete Computerprogramme herangezogen werden.

Zu niedrige Temperaturen führen zu einer verstärkten Bildung unspezifischer PCR-Produkte. Bei zu hohen Temperaturen kann keine Hybridisierung der Primer erfolgen. Eine Inkubationszeit von 0,5-2 min ist für diesen Schritt in der Regel ausreichend.

Synthese

Die Temperatur dieses Reaktionsschrittes liegt normalerweise zwischen 70 und 75 °C. In diesem Temperaturbereich ist die Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase am höchsten. Die Dauer dieses Schrittes hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab. Für PCR Produkte mit einer Länge von bis zu 2 kb wird eine Inkubationszeit von 1 min empfohlen. Sollen größere Fragmente amplifiziert werden, ist die Inkubationszeit um 1 min für jedes weitere Kilobasenpaar zu erhöhen.

Finale Strangsynthese

Nach Beendigung des letzten Zyklus werden die PCR-Ansätze für gewöhnlich abschließend für 5-15 min bei 72 °C inkubiert. Dieser Schritt dient der Vervollständigung der zuletzt generierten PCR-Produkte. Darüber hinaus werden in diesem Schritt durch die terminale Transferaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase A-Nucleotide an die 3'-Enden der PCR-Produkte angefügt. Sollen die PCR-Produkte später in T/A Vektoren kloniert werden, empfiehlt sich eine Verlängerung dieses Reaktionsschrittes auf bis zu 30 min.

Zahl der Zyklen

Die Zahl der Zyklen hängt im wesentlichen von der Anzahl der Ausgangsmoleküle und der erwarteten Menge an PCR-Produkt ab. Eine Zyklenzahl von mehr als 40 sollte dabei wegen der Entstehung unspezifischer PCR-Produkte stets vermieden werden. Die folgende Übersicht gibt ungefähre Richtwerte für die Zyklenzahl bei verschiedenen Mengen an Ausgangsmaterial wieder.

Anzahl der Ausgangsmoleküle	Zyklenzahl
10^5	25-30
10^4	30-35
10^3	35-40
50 und weniger	20-30*

* Anschließend zweite PCR mit zweitem Primerpaar, welches zwischen den beiden ersten Primern an die Zielsequenz bindet.

2.10 Datenverarbeitung

Die zur Auswertung der verschiedenen Endpunkte angewendeten Verfahren sind der jeweiligen Arbeitsvorschrift zu entnehmen (Anhang).

Zur effizienten Auswertung der in großen Mengen anfallenden Daten wurde ein Excel basiertes Auswerteprotokoll entwickelt, mit dem eine halbautomatische Prozessierung der Rohdaten und die standardisierte Dokumentation der einzelnen Versuche ermöglicht wird.

Zur Auswertung werden die am Lesegerät für Mikrotestplatten ermittelten Rohdaten in die entsprechenden Felder der Auswertemaske kopiert (hier nicht gezeigt). Die Prozessierung der Daten (z. B. Bereinigung um die Zellzahl) erfolgt anschließend voll automatisch und alle relevanten Ergebnisse werden in einem ausdruckbaren Formular dargestellt (s. Abb. 2.1). Das Formular gliedert sich in verschiedene Bereiche. Auf der linken Hälfte sind durch manuelle Eingabe Angaben zur Art der untersuchten Probe zu machen. Zunächst ist zwischen *Einzelsubstanz* und *komplexer Probe* zu wählen [1]. Anschließend wird der Versuch durch eine Analysennummer gekennzeichnet [2]. Bei der Untersuchung von komplexen Proben öffnen sich weitere Felder für detaillierte Angaben zur untersuchten Probe wie z. B. dem pH-Wert der Probe [3], diese Angaben entfallen bei der Untersuchung von Einzelstoffen. Es folgen Angaben zum Test. Hier sind Datum, Uhrzeit und Testdauer des Versuches zu dokumentieren [4]. Anschließend folgt eine für den Parameter *Wachstumshemmung* relevante Überprüfung des Zellwachstums (Erhöhung der Trübung im Versuchszeitraum um mindestens das fünffache) in den Negativkontrollansätzen sowohl für den *Indikatorstamm* als auch für den *Kontrollstamm* [5].

Unter *Allgemeines* sind der Name des Bearbeiters und besondere Bemerkungen festzuhalten [6].

Im rechten oberen Teil erfolgt die eigentliche Darstellung der Versuchsergebnisse. Dort sind für *Indikatorstamm* und *Kontrollstamm* Angaben zu den bei den verschiedenen Konzentrationen bzw. Verdünnungsstufen [7] erzielten Wachstumshemmwerten [8] enthalten. Des Weiteren sind die errechneten mittleren (geometrisches Mittel) Induktionsraten (Q) aus sechs Kavitäten [9] und die zugehörigen Signifikanzfaktoren (S), die die Streuung in den einzelnen Kavitäten berücksichtigen [10], dargestellt. Überschreitet die Induktionsrate den zugehörigen Signifikanzfaktor, bewertet das Auswerteprotokoll diese Konzentration bzw. Verdünnungsstufe automatisch als gentoxisch (Gentoxizität: *Ja/Nein*), sofern gleichzeitig eine Wachstumshemmung von 50 % nicht überschritten wird [11]. Darüber hinaus sind die absoluten Nettofluoreszenzwerte angegeben [12], dazu zum Vergleich die Hintergrundfluoreszenz des Nährmediums [13].

Unterhalb des *Ergebnisfeldes* sind Angaben zu Art und Konzentration der verwendeten Positivkontrollsubstanz wie z. B. „MNNG 0,81 mg/l“ zu machen [14].

Das Protokoll bewertet selbständig die Gültigkeit des Versuchs [15]. Dazu werden die Ergebnisse der Positivkontrollen für beide Stämme herangezogen. Nur wenn der *Indikatorstamm* dort ein positives (Gentoxizität: *Ja*) und der Kontrollstamm gleichzeitig ein negatives Ergebnis (Gentoxizität: *Nein*) aufweist, wird der Versuch als *gültig* eingestuft. Andernfalls erfolgt die Einstufung *ungültig*.

Abschließend ist unter *Testergebnis* die Konzentration (bei Einzelstoffen) bzw. Verdünnungsstufe (bei komplexen Proben) anzugeben [16], bei der der *Indikatorstamm* erstmals nachhaltig ein positives Ergebnis ausweist (im Beispiel 0,08 mg/l). Das Formular ist auf der beiliegenden CD-Rom als Excel-Datei abgelegt.

[1] **HEFETEST**
Gentoxizität ☒ Einzelsubstanz ☐ Komplexe Probe

Angaben zur Probe

Analysennummer
Extern:
Intern:

Zeitpunkt der Probenahme:
Zeitpunkt der Lieferung:
Lieferant:

pH-Wert:
Eingestellt:
Konservierungsart:
(Temperaturkonstanz, Kühlen, Gefrieren)

Organoleptische Eigenschaften: Trübung Farbe
Geruch

Angaben zum Test

Testbeginn
Datum:
Uhrzeit:
Testdauer [h]:

Gültigkeitskriterium Wachstum

	Indikatorstamm	Kontrolle
OD (Testbeginn)	0,024	0,023
OD (Testende)	0,240	0,163
Erhöhung der Trübung (Faktor)	9,8	7,3

Allgemeines: Bearbeiter:

	Hemmung [%]	Q	S	Gentoxizität	Fluoreszenz (netto)
Testansätze (Indikatorstamm): Konzentration/Verdünnungsstufe		[9]	[10]	[11]	[12]
0,0625	2,74	1,023	1,026	Nein	8373
0,08	4,80	1,067	1,021	Ja	8731
0,125	6,22	1,110	1,021	Ja	9083
0,16	8,00	1,126	1,019	Ja	9215
Negativkontrolle	0	1,000	1,025	NEIN	8187
Positivkontrolle	44,75	1,663	1,019	Ja	13614
Testansätze (Kontrollstamm): Konzentration/Verdünnungsstufe		[8]	[13]	Hintergrund	283
0,0625	2,03	1,002	1,087	Nein	554
0,08	4,75	0,955	1,120	Nein	530
0,125	4,12	0,946	1,131	Nein	526
0,16	8,62	0,985	1,106	Nein	546
Negativkontrolle	0	1,000	1,070	NEIN	551
Positivkontrolle	47,79	1,066	1,157	Nein	595

Referenzsubstanz [14] >

Ergebnis: [15] >

Testergebnis

Schwellenkonzentration [mg/l]

Kleinste gentoxische Verdünnungsstufe (Gesamt)

Bemerkungen:

[6]

Abb. 2.1 Dokumentationsformular für den Hefetest. Das ausdrückbare Formular enthält alle wesentlichen Angaben zur Probe und die aufgearbeitete Darstellung aller relevanten Ergebnisse einer Mikrottestplatte. (Stand 01.01.2005)

3 Ergebnisse

3.1 Gentechnisch modifizierter Hefe-Teststamm

In *S. cerevisiae* Wildtypstämmen ist ein so genanntes *pleiotropic drug resistance*-Netzwerk (PDR-Netzwerk, Balzi *et al.*, 1995) für die Ausbildung eines Phänomens verantwortlich, das als *multiple drug resistance* (MDR) bezeichnet wird (Kolaczowska *et al.*, 1999). Dabei wird u. a. unter dem Einfluss bestimmter toxischer Verbindungen das Expressionsniveau von Genen erhöht, deren Produkte für den auswärts gerichteten Transport toxischer Verbindungen verantwortlich sind. Dabei weisen die verschiedenen Transportproteine sehr breite und z. T. überlappende Substratspektren auf. Zu den transportierten Verbindungen gehören in ihrer Wirkung divergierende Substanzen wie Antibiotika, Detergenzien, Fungizide und Ionophoren (Kolaczowski *et al.*, 1997; Kolaczowski *et al.*, 1998). Bei diesen Substanzen handelt es sich überwiegend um kleine, hydrophobe Moleküle. Für solche Verbindungen erhöht die Aktivität der Transporter das Verhältnis aus Dosis und Wirkung deutlich, was die Empfindlichkeit des zu Grunde liegenden Verfahrens reduziert. Zur Steigerung der Empfindlichkeit des Verfahrens wurde daher ein Stamm verwendet, in dem die Gene dreier dieser Transportsysteme deletiert worden sind. Bei den angesprochenen Systemen handelt es sich um *PDR5* (*pleiotropic drug response*), *SNQ2* (vermittelt eine erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber 4-NQO) und *YOR1* (*yeast oligomycin resistance*). Zur Charakterisierung der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp wurden mit beiden Stämmen Wachstumsversuche bei einem pH-Wert von 6,4 durchgeführt. Für die Substanz 4-Nitroquinolin-*N*-oxid (4-NQO, Abb. 3.1 a) konnte genau wie für 2-Aminoanthracen (2-AA, Abb. 3.1 b) eine erhöhte Empfindlichkeit der Deletionsmutante gegenüber dem Wildtypstamm festgestellt werden. Für die ebenfalls unpolare Substanz 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin (MNNG, Abb. 3.1 c) konnte hingegen keinerlei Unterschied in der Empfindlichkeit beider Stämme festgestellt werden. Gegenüber hexavalentem Chrom (Cr(VI), Abb. 3.1 d) wurde eine verringerte Empfindlichkeit festgestellt.

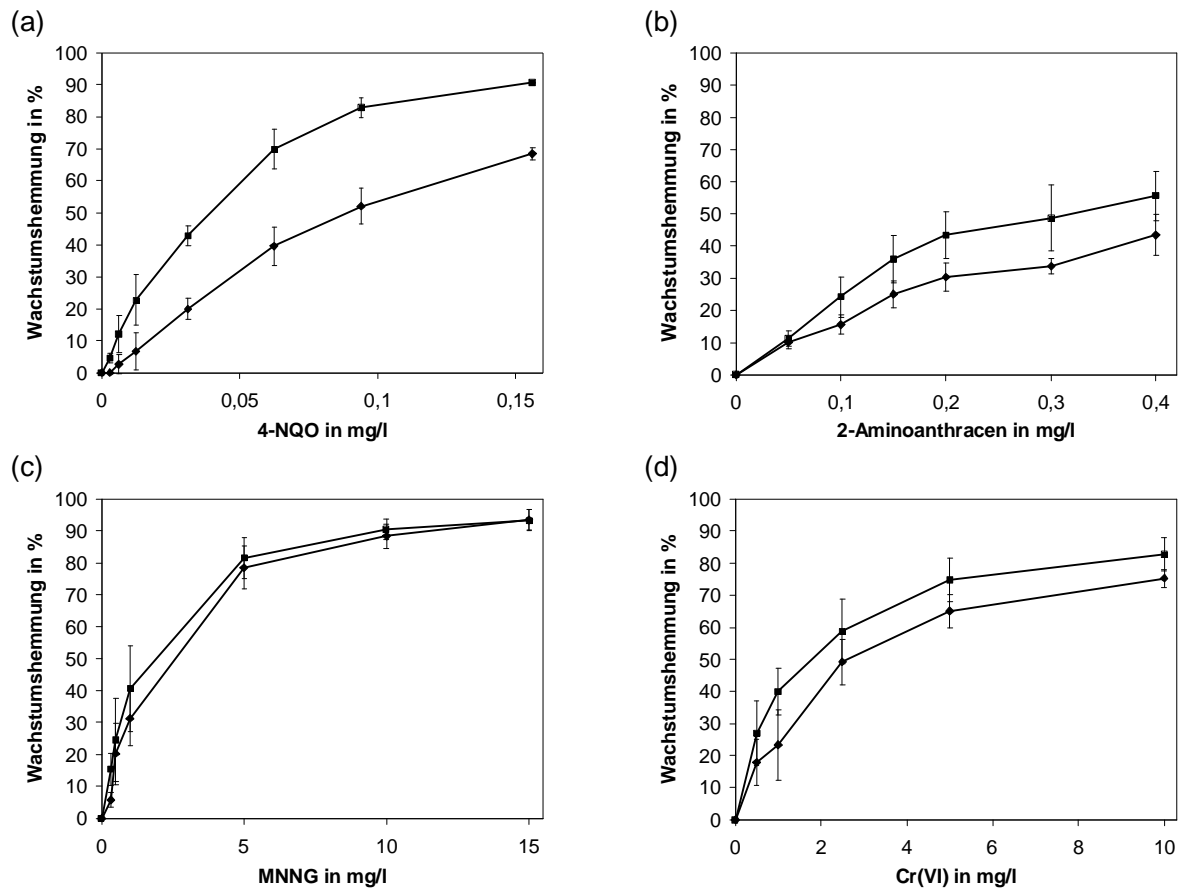


Abb. 3.1 Erhöhte Empfindlichkeit von *S. cerevisiae* gegenüber bestimmten Substanzen durch Deletion der Gene *PDR5*, *SNQ2* und *YOR1*. Die Diagramme zeigen Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Konzentration in mg/l gegen die resultierende Wachstumshemmung in %) sowohl für den Wildtyp (♦) als auch für die Deletionsmutante (■) unter Einwirkung von 4-NQO (a), 2-Aminoanthracen (b), MNNG (c) und Cr(VI) (d). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben ($n \geq 6$ Versuche, jeweils in sechsfacher Ausführung). Die Inkubationsdauer betrug 8 h.

3.2 Qualitätssicherung

3.2.1 Entwicklung eines geeigneten Nährmediums für das hefebasierte Testverfahren

Für die ersten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde das handelsübliche YNB-Medium der Firma *DIFCO* bei einem pH-Wert von 5,9 verwendet. Messungen des pH-Wertes jeweils zu Versuchsbeginn und nach Versuchende zeigten, dass die Stoffwechselaktivität wachsender Hefezellen während der achtstündigen Versuchszeit zu einer Ansäuerung des Mediums auf pH-Werte von ca. 3,0 bis 3,5 führte. Diese Ansäuerung des Mediums ist auf die Aktivität von Pma1 zurückzuführen (s. 1.2). Für die Bewertung potenziell das Wachstum einschränkender, toxischer Agenzien ist eine solche pH-Abtrift jedoch von Nachteil, da die Toxizität einiger Substanzen, insbesondere solcher, die unter dem Einfluss des pH-Wertes ionisieren, durch die Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst wird (Witters, 1998). Um die Toxizität von Substanzen unter ähnlichen Bedingungen zu testen, wie sie normalerweise in Oberflächengewässern (pH-Werte von 6,5 bis 8,5) vorgefunden werden, sollte der an dieser Spanne auszurichtende pH-Wert des Nährmediums über den Versuchszeitraum von 8 Stunden konstant gehalten werden. Die pH-Konstanthaltung ist ein wesentliches Element bei der Standardisierung von Testbedingungen und trägt u. a. dazu bei, dass Testergebnisse reproduzierbar sind. Zunächst wurde ein Phosphatpuffer (Dihydrogenphosphat, 0,2 M) bei einem eingestellten pH-Wert von 5,9 verwendet. Dieser war für die Untersuchung organischer Substanzen geeignet. Bei der Bestimmung der Toxizität von Schwermetallen stellte sich aber heraus, dass Reaktionen zwischen den gelösten Metallen und Phosphaten Ausfällungen verursachten. Durch das Ausfallen einer Substanz wird deren Bioverfügbarkeit herabgesetzt und dadurch möglicherweise eine geringere Toxizität bestimmt, als tatsächlich vorhanden. Bei der Wahl eines alternativen Puffers war außerdem zu beachten, dass bei einem pH-Wert von >7 mehrwertige Metalle in Form von Hydroxyden ausfallen (mündl. Mitteilung GLAUM, Universität Bonn), was ebenfalls zur Herabsetzung der Bioverfügbarkeit der entsprechenden Substanz führen kann. Messungen mit Kupfersulfat in einem TRIS gepufferten Medium bei pH 7,0 bestätigten dies. Die unter diesen Bedingungen ermittelten EC_{50} -Werte für Cu^{2+} Ionen lagen signifikant über denen anderer Testverfahren (Faktor 100). Gelöst wurde das Problem durch die Verwendung eines Citratpuffers (Zitronensäure-Monohydrat, 0,1 M), der über drei pKs-Werte (3,13; 4,76 und 6,4) verfügt. Durch Titrationsversuche von Medien mit verschiedenen Pufferkonzentrationen ergab sich, dass eine Pufferkonzentration von 50 mmol/l ausreichend ist, den pH-Wert über den Versuchszeitraum konstant zu halten. So liegt die pH-Abtrift unter diesen Bedingungen nach 8 h bei weniger als 0,2

pH-Einheiten (24 h: < 0,4 pH-Einheiten). Aufgrund der relativ geringen Pufferkonzentration sind für das Einstellen eines pH-Wertes von 6,4 entsprechend geringe Mengen Natronlauge nötig, so dass die Gesamtsalzkonzentration des Mediums das Gültigkeitskriterium des 5fachen Wachstums nicht negativ beeinflusst.

3.2.2 Alterung des Nährmediums und die damit verbundene Eigenfluoreszenz-abtrift

Viele der bekannten Nährmedien dunkeln im Laufe der Zeit nach. Begleitet wird die farbliche Änderung von einer wahrscheinlichen stofflichen Veränderung z. B. durch oxidative Prozesse und damit von sich verändernden Bedingungen für Stoffwechsel und Wachstum des jeweiligen Organismus. Daher wurde der Einfluss des Alters des verwendeten Nährmediums auf die Parameter Trübung und Fluoreszenz getestet. Als Referenzzeitpunkt (Tag 1) galt der Morgen nach der Dampfsterilisation. Ein messbarer Einfluss des Medium-Alters auf die Parameter Wachstum und Hintergrundtrübung konnte innerhalb des Testzeitraumes von bis zu zwölf Tagen nicht nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzeigenschaften des Mediums ließen jedoch einen deutlichen Einfluss des Alters erkennen (s. Abb. 3.2). Mit zunehmendem Alter nimmt die durch das Nährmedium verursachte Hintergrundfluoreszenz stetig ab. Um einen Einfluss auf die Messung der GFP spezifischen Fluoreszenz auszuschließen, wurden daher für einen Versuch keine Nährmedien aus unterschiedlichen Chargen oder Mischungen aus solchen verwendet.

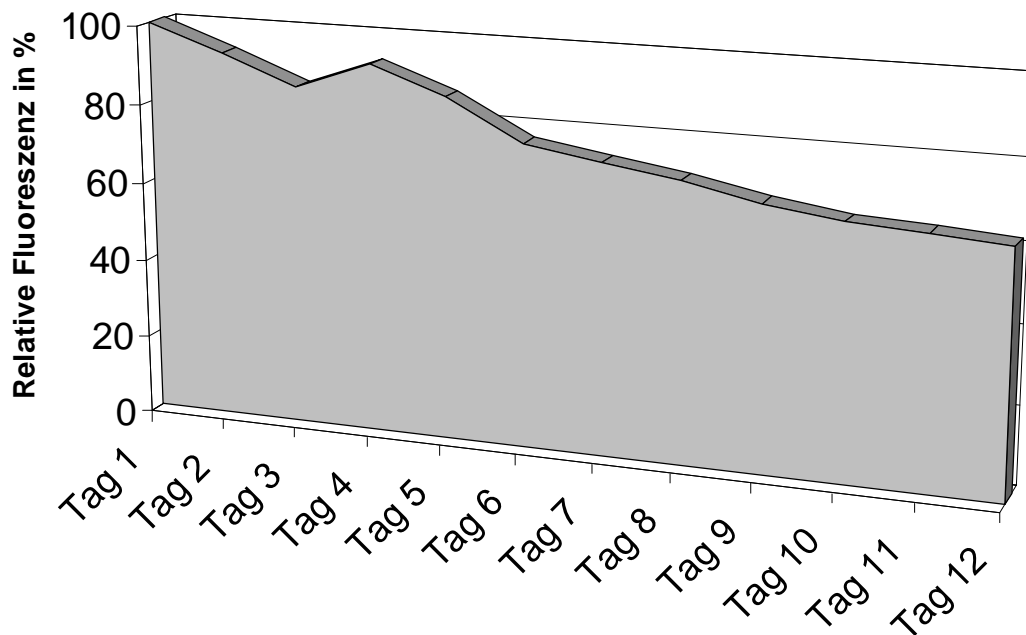


Abb. 3.2 Altersbedingte Abnahme der Eigenfluoreszenz von YNB-Nährmedium. Die an Tag 1 ermittelten Fluoreszenzwerte bildeten den Vergleichsmaßstab (Fluoreszenz = 100 %). Im Diagramm sind die an den Folgetagen durchschnittlich erreichten Fluoreszenzintensitäten als relative Werte in Prozent zur Ausgangsfluoreszenz angegeben. Die einzelnen Datenpunkte sind Mittelwerte aus sechs Einzelversuchen in mindestens vierfacher Wiederholung.

3.2.3 Verwendung von Mikrottestplatten

Bei auf Mikrottestplatten basierenden Biotestverfahren werden unabhängig vom jeweilig untersuchten Parameter zur Bewertung stets Daten einer Kavität zu Daten einer anderen in Relation gesetzt. Das setzt jedoch voraus, dass die Bedingungen, die in den einzelnen Kavitäten einer Mikrottestplatte vorherrschen, eine hohe Vergleichbarkeit aufweisen (Platteneffekte). Anhand zweier Beispiele soll dies kurz aufgezeigt werden. Bei Biotestverfahren, bei denen eine von der Raumtemperatur abweichende Inkubationstemperatur verwendet wird, werden die Mikrottestplatten bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Dies ist in Klimakammern, aber auch in den Lesegeräten für Mikrottestplatten selbst möglich. Im ersten Fall ist eine homogene Temperaturverteilung gewährleistet. Bei der Inkubation in Lesegeräten ist aus technischen Gründen ein gewisser Temperaturgradient nicht zu vermeiden. Dieser Temperaturgradient bewirkt, dass nicht überall identische Wachstumsbedingungen vorliegen und ein Vergleich der erzielten Ergebnisse verschiedener Kavitäten erschwert wird. Ein weiteres Problem liegt darin, dass es bei zunehmender Versuchsdauer zu Verdunstungseffekten kommt. Diese Verdunstungseffekte sind an den Randbereichen einer Mikrottestplatte am

größten und nehmen zur Plattenmitte hin ab. Da Verdunstung dazu führt, dass sich die Konzentration einer nicht verdunstenden, zu untersuchenden Substanz in der Kavität erhöht, kann das Ergebnis verfälscht werden. Um mögliche Unterschiede zwischen den Kavitäten einer Platte wie z. B. Randeffekte zu ermitteln und ggf. die Plattenbelegung daraufhin abzustimmen, wurde in mehreren Versuchen untersucht, ob signifikante und reproduzierbare Unterschiede im Wachstum sowie in der Fluoreszenzentwicklung zwischen den einzelnen Reihen und Spalten einer Mikrottestplatte festzustellen sind. Dafür wurden sämtliche Kavitäten einer Mikrottestplatte (Greiner; Cellstar #655185) einheitlich mit 200 µl einer Zellsuspension ($OD_{600} = 0,1$) beschickt und nach einer Inkubation von 8 h bei 30 °C (siehe Arbeitsvorschriften im Anhang) die erreichten Trübungs- und Fluoreszenzwerte bestimmt. Die Resultate für Trübungswerte sowie Fluoreszenzintensitäten sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen sowohl für die acht Zeilen (Abb. 3.3 a+b) als auch für die zwölf Spalten (Abb. 3.3 c+d) einer 96er Mikrottestplatte aufgeführt. Weder in Bezug auf die Trübungswerte noch auf die Fluoreszenzintensitäten wichen die einzelnen Reihen signifikant voneinander ab. Das gleiche galt für den Vergleich innerhalb der Spalten. Tendenziell war allenfalls ein leichter Abfall der Werte zu den Randbereichen der Platte hin zu beobachten. Zur statistischen Absicherung wurden die waagerechten Reihen (Zeilen) A-H mit Hilfe eines DUNN-Testes (Signifikanzniveau = 0,05) daraufhin geprüft, ob ihre Mittelwerte sich signifikant voneinander unterscheiden (für die Mittelwerte aus sechs Einzelversuchen und für jeden Einzelversuch separat). Bei diesem Test handelt es sich um einen Assoziationstest für mehrere Stichproben. Eine Normalverteilung der Daten ist bei diesem Verfahren nicht erforderlich. Ebenso wurde mit den senkrechten Reihen (Spalten) 1-12 verfahren. Ein Randeffekt wurde bei keinem der beiden Parameter festgestellt. Die teilweise bei den Einzelversuchen aufgetretenen Unterschiede zwischen den einzelnen Reihen sind als eher zufällig zu betrachten, da sich über sechs Einzelversuche hinweg betrachtet keine Tendenz erkennen ließ.

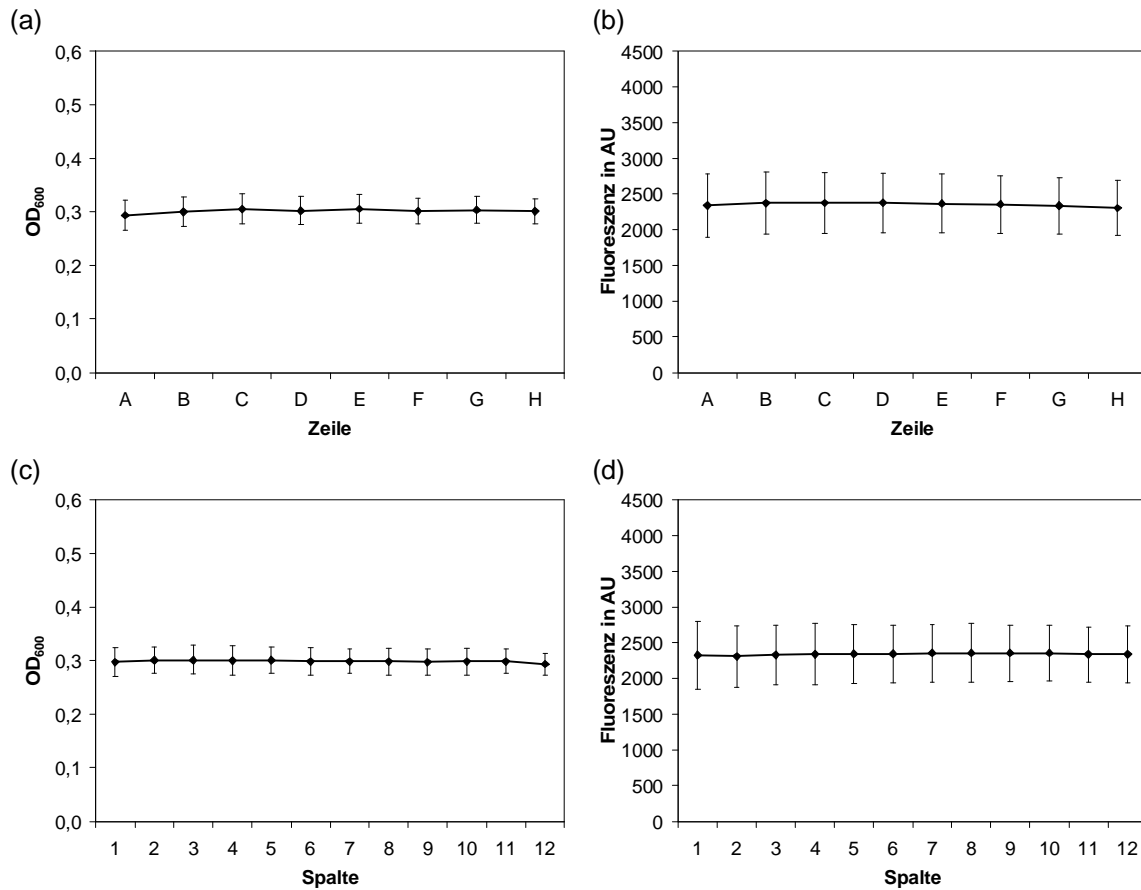


Abb. 3.3 Untersuchungen zu möglichen Platteneffekten. Darstellung von Trübungswerten (linke Seite) und Fluoreszenzintensitäten (rechte Seite) für die einzelnen Zeilen (a+b) und die einzelnen Spalten (c+d) einer Mikrottestplatte mit 96 Kavitäten (Greiner; Cellstar #655185). Die Darstellung der Datenpunkte in den Diagrammen erfolgt in Form von Mittelwerten \pm SD ($n = 6$ Versuche; für Zeilen mit zwölf, für Spalten mit acht Replikaten). Trübungs- sowie Fluoreszenzwerte sind als nennwertlose Größen angegeben.

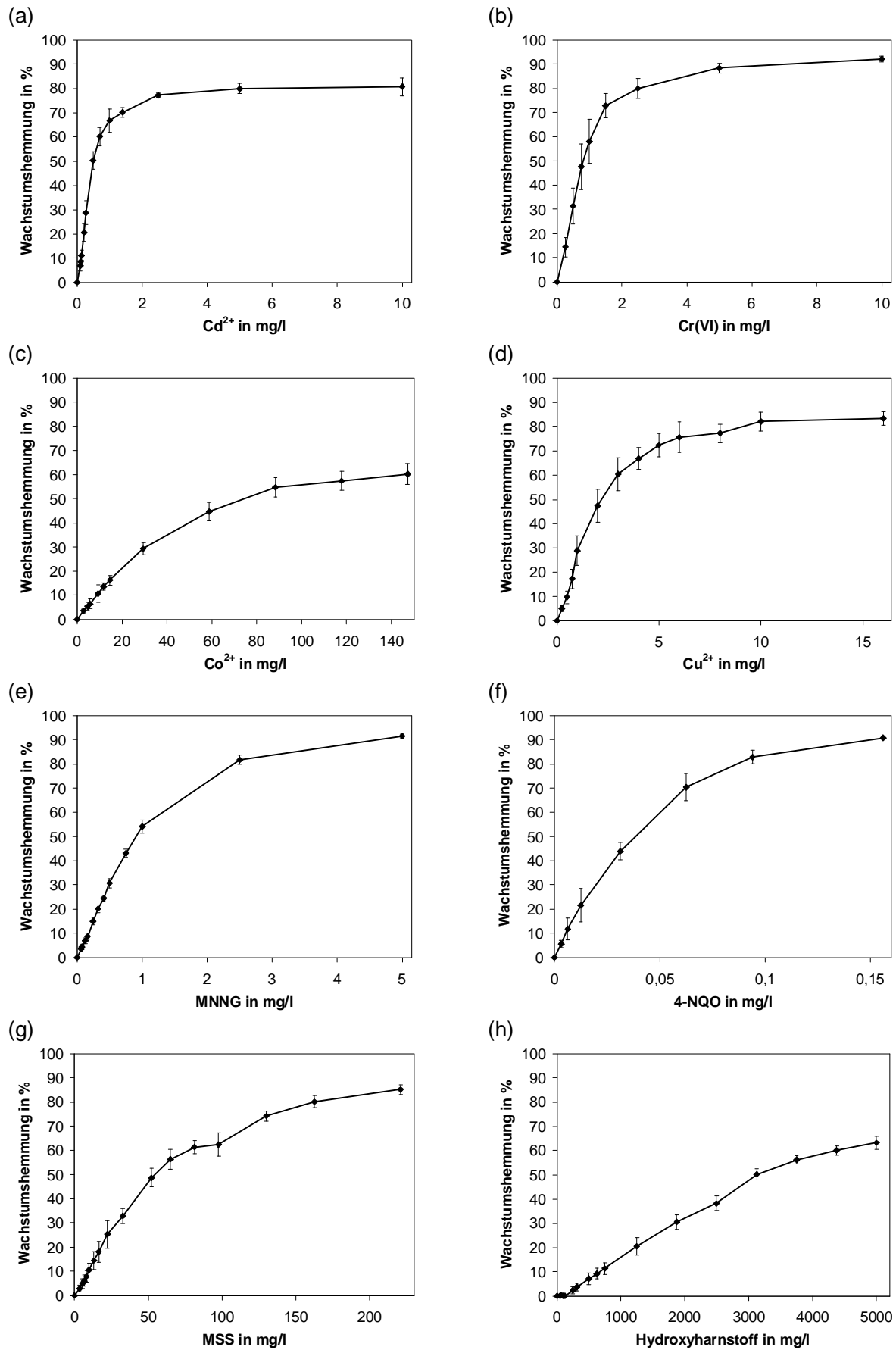
3.3 Wachstumshemmung als Parameter cytotoxischer Effekte

Untersuchungen zur Cytotoxizität werden durchgeführt, um die Langzeitwirkung von toxischen Verbindungen auf eine Organismenart abschätzen zu können. In der Ökotoxikologie kommen zur Beurteilung cytotoxischer Potenziale in der Regel Wachstumshemmtests mit Mikroorganismen zum Einsatz, bei denen der Einfluss einer Substanz oder einer Probe auf das Teilungsverhalten des jeweiligen Testorganismus untersucht wird. Die Testzeit verläuft daher über mindestens zwei Generationen. Die Hemmung des Wachstums spiegelt die Summe aller möglichen toxischen Einzeleffekte wider, nicht jedoch die zu Grunde liegenden Wirkmechanismen. Diese können zwar sehr unterschiedlich sein, summieren jedoch letztlich alle in einem negativen Einfluss auf das Wachstum eines Organismus. Für den Nachweis cytotoxischer Effekte wurde ein auf der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* basierendes Verfahren etabliert, das auf dem verminderten Wachstum der Hefe unter Einfluss von Testsubstanzen unter definierten Bedingungen beruht. Als Maß für das Wachstum gilt die Zunahme der Trübung (OD_{600}) im Versuchszeitraum. Die Trübungszunahme fällt bei steigender Konzentration einer toxischen Substanz zunehmend geringer aus. Die erzielten Ergebnisse wurden in international anerkannten Einheiten (z. B. mg/l) als die *effective concentration* (EC) angegeben, die eine Wachstumshemmung von 20 % (EC_{20} -Wert) bzw. 50 % (EC_{50} -Wert) verursacht.

3.3.1 Untersuchung verschiedener Monosubstanzen

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden unter Verwendung der im Anhang aufgeführten Arbeitsvorschrift erzielt. Dazu wurde die sensitive Mutante (s. 3.1) bei einem pH-Wert von 6,4 verwendet. Die Untersuchung umfasste Substanzen unterschiedlicher chemischer Natur und mit verschiedenen Wirkmechanismen. Dazu gehörten die Schwermetalle Cadmium (Cd^{2+}), Chrom ($Cr(VI)$), Cobalt (Co^{2+}) und Kupfer (Cu^{2+}) ebenso wie die organischen, vorwiegend gentoxischen Substanzen Hydroxyharnstoff, MNNG, 4-NQO und Methyl-Methansulfonat (MMS). Ebenso wurden das primär neurotoxisch wirkende Insektizid Lindan, das ZNS Stimulans Coffein, das vielfach als chemisches Vorprodukt eingesetzte 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP), das Schmerzmittel Acetaminophen (Paracetamol) sowie das Analgetikum Diclofenac untersucht. Darüber hinaus wurde auch die mögliche Toxizität von herkömmlichem Kochsalz ermittelt. Als Maß für die Cytotoxizität wurden für alle Substanzen (soweit möglich) rechnerisch EC_{20} - und EC_{50} -Werte (basierend auf der Messung nach 8 h) ermittelt (Tabelle 3.1). Die höchste Cytotoxizität unter den Schwermetallen (Abb. 3.4 a-d) wurde für Cadmium (als Cd^{2+}) mit einem EC_{50} -Wert von 0,8 mg/l (EC_{20} -Wert: 0,18 mg/l) er-

mittelt. Die Toxizität von hexavalentem Chrom (Cr(VI)) war mit einem EC_{50} -Wert von 0,88 mg/l (EC_{20} -Wert: 0,27 mg/l) etwas geringer. Ein bereits deutlich höherer EC_{50} -Wert und damit eine geringere Cytotoxizität wurde mit 2,52 mg/l (EC_{20} : 0,74 mg/l) für Kupfer (Cu^{2+}) ermittelt. Die geringste Toxizität innerhalb der Schwermetalle wies Cobalt (Co^{2+}) mit einem EC_{50} -Wert von 82,92 mg/l (EC_{20} : 19,0 mg/l) auf. Ebenfalls deutliche Unterschiede konnten innerhalb der Gruppe der unpolaren Substanzen beobachtet werden (Abb. 3.4 e-h). Der insgesamt niedrigste EC_{50} -Wert wurde für 4-NQO mit 0,0324 mg/l (EC_{20} : 0,0113 mg/l) ermittelt. Für MNNG lag die Konzentration, die zu einer Wachstumshemmung von 50 % führte, bei 0,9156 mg/l (EC_{20} : 0,32 mg/l) und damit bereits etwa um den Faktor 30 höher. Ein noch höherer EC_{50} -Wert wurde mit 55,95 mg/l (EC_{20} : 18,0 mg/l) für MMS berechnet. Den geringsten hemmenden Einfluss auf das Wachstum der Hefe innerhalb dieser Substanzgruppe hatte mit einem EC_{50} -Wert von 3311 mg/l (EC_{20} : 1189 mg/l) Hydroxyharnstoff. Die EC -Werte von 3,5-DCP (Abb. 3.4 i) lagen mit 9,23 mg/l (EC_{50}) und 5,51 mg/l (EC_{20}) im mittleren Bereich. Auch Lindanexposition (Abb. 3.4 j) führte bei steigenden Konzentrationen zu einer zunehmenden Hemmung des Wachstums, mit einem EC_{50} -Wert von 8,28 mg/l (EC_{20} : 3,14 mg/l). Für die Arzneimittel Diclofenac und Acetaminophen (Paracetamol; Abb. 3.4 k+l) lagen die jeweiligen EC -Werte mit 246,6 mg/l (EC_{20} : 115,7 mg/l) für Diclofenac und 1425 mg/l (EC_{20} : 555 mg/l) für Acetaminophen recht hoch. Für Coffein konnte ebenfalls nur ein geringer cytotoxischer Effekt (EC_{50} : 640,7 mg/l; EC_{20} : 250,2 mg/l) beobachtet werden (Abb. 3.4 m). Der höchste EC_{50} -Wert und damit die geringste Toxizität der untersuchten Substanzen wurde mit 11292 mg/l für Natriumchlorid (Abb. 3.4 n) ermittelt (EC_{20} : 4870 mg/l). Sämtliche EC -Werte sind mit den zugehörigen Vertrauensintervallen in der Übersichtstabelle 3.1 zusammengefasst.



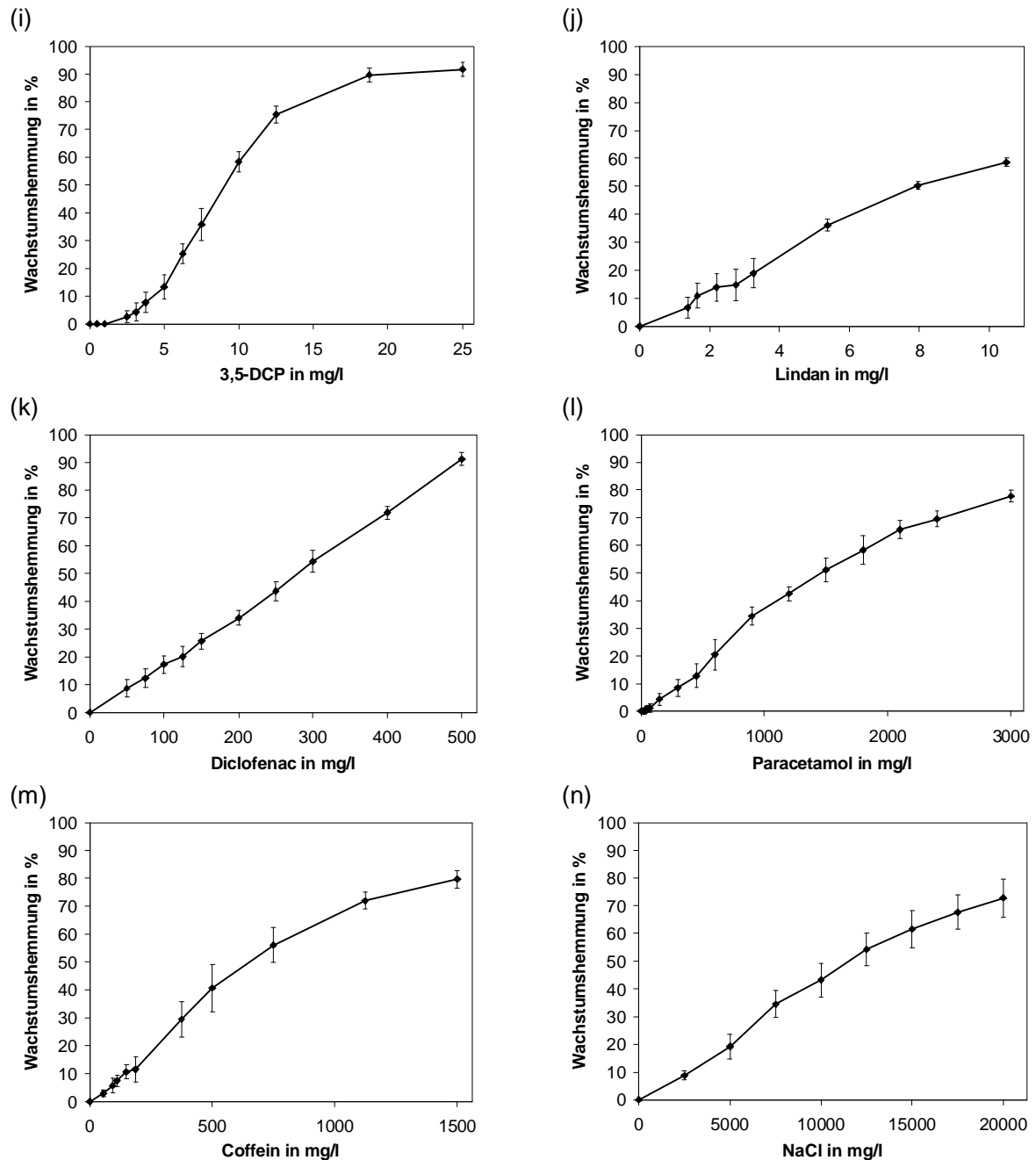


Abb. 3.4 Konzentrations-Wirkungs-Kurven für verschiedene Monosubstanzen. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD aus >10 Versuchen mit je sechs Replikaten. Die Fehlerbalken einiger Datenpunkte sind kleiner als das entsprechende Symbol (z. T. aus Schmitt *et al.*, 2005).

Ergebnisse

Tab. 3.1 Übersichtsdarstellung der ermittelten *EC*-Werte zur Cytotoxizität mit zugehörigen Vertrauensintervallen (95 %). Bei den aufgeführten Schwermetallen beziehen sich die Konzentrationsangaben auf die in Klammern stehenden Ionen, nicht auf das Salz. Geordnet nach Substanzklassen.

Substanzklasse	Substanz	getesteter Konzentrationsbereich in mg/l	Zahl der getesteten Konzentrationsstufen	EC ₂₀ -Wert in mg/l	Vertrauensintervall 95 % in mg/l	EC ₅₀ -Wert in mg/l	Vertrauensintervall 95 % in mg/l
<i>Schwermetallionen</i>	Cadmiumchlorid-1-hydrat (Cd ²⁺)	0,1-10	12	0,18	0,09 - 0,27	0,8	0,55-1,20
	Cobaltnitrat (Co ²⁺)	2,945-147,25	11	19,0	17,77 - 20,26	82,92	77,12 - 89,43
	Kaliumdichromat (Cr(VI))	0,26-10	8	0,27	0,17 - 0,38	0,88	0,69 - 1,10
	Kupfersulfat Pentahydrat (Cu ²⁺)	0,25-16	12	0,74	0,58 - 0,91	2,52	2,19-2,89
<i>Arzneimittel</i>	Acetaminophen (Paracetamol)	15-3000	18	555	502 - 606	1425	1334-1527
	Diclofenac	50-500	10	115,7	90,2-138,1	246,6	211,6-295,7
	Hydroxyharnstoff	50-5000	16	1189	1125 - 1252	3311	3151-3348
<i>Pestizide</i>	Lindan	1,375-10,5	8	3,14	2,90-3,39	8,28	7,53-9,25
<i>PCPs</i>	3,5-Dichlorphenol	0,5-25	12	5,51	5,09 - 5,92	9,23	8,68 - 9,85
<i>ZNS Stimulans</i>	Coffein	56,25-1500	10	250,2	231,1-269,5	640,7	591,3-699,8
<i>Gentoxine</i>	Methyl Methansulfonat (MMS)	3,25-221	16	18	17,26 - 18,74	55,95	54,05-57,94
	MNNG	0,0625-5	12	0,32	0,30 - 0,34	0,9156	0,8535 - 0,9861
	4-Nitroquinolin- <i>N</i> -oxid	0,003125-0,156	8	0,0113	0,0082-0,0145	0,0324	0,0281-0,0375
<i>Sonstige</i>	Natriumchlorid	2500-20000	8	4870	4530-5180	11294	10874-11727

3.3.2 Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Toxizität von Schwermetallen

Die Wasserstoffionenkonzentration bzw. der pH-Wert von (Ab-)Wasserproben kann stark variieren. In natürlichen Oberflächengewässern sind selbst pH-Werte von deutlich unter 6 keine Seltenheit. Durch den Eintrag von saurem Regen zum Beispiel kann es, je nach mineralischer Beschaffenheit des Untergrundes (Unterscheidung zwischen kalkarmen Silikat- und kalkreichen Karbonatgewässern), zu einer deutlichen Absenkung des pH-Wertes kommen. In der Regel liegt der pH-Wert von unbelasteten Oberflächengewässern jedoch deutlich über 6,5, meistens bei etwa 7,0. Die Toxizität vieler Substanzen hängt aber stark von deren Ladungszustand ab, auf den der pH-Wert einen direkten Einfluss hat. Im wesentlichen kann ein Zusammenhang zwischen pH-Wert und der Toxizität einer Substanz für all die Verbindungen erwartet werden, deren Ionisierungszustand vom pH-Wert beeinflusst wird (Witters, 1998).

Um den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Toxizität von Schwermetallen und die prinzipielle Eignung des Verfahrens für Untersuchungen bei niedrigen pH-Werten zu überprüfen, wurden die Schwermetalle Cadmium (als Cd^{2+}), Chrom (Cr(VI)), Cobalt (Co^{2+}), Kupfer (Cu^{2+}) und Zink (Zn^{2+}) bei zwei unterschiedlichen pH-Werten (6,4 und 4,75) untersucht. Dabei wurden die Zellen abweichend von Arbeitsvorschrift bei der Zellernte nicht abzentrifugiert und das verbrauchte Nährmedium nicht entfernt.

Der geringste Einfluss des pH-Wertes auf die Toxizität wurde für Cadmium festgestellt. Die Kurve, die bei pH 4,75 aufgenommen wurde, unterscheidet sich nicht signifikant von der Auftragung für pH 6,4 (Abb. 3.5 a; Überschneidung der Fehlerbalken). Die Toxizität von hexavalentem Chrom hingegen wurde bei Absenkung des pH-Wertes auf 4,75 deutlich reduziert (Abb. 3.5 b). Bei der Untersuchung von Cobalt wurde bei pH 4,75 im niedrigen Konzentrationsbereich eine reduzierte Toxizität festgestellt, bei erhöhten Konzentrationen jedoch nicht (Abb. 3.5 c). Der deutlichste Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Toxizität wurde bei der Untersuchung von Cu^{2+} und Zn^{2+} festgestellt (Abb. 3.5 d+e), wobei für Cu^{2+} eine deutlich verringerte Wachstumshemmung bei pH 4,75 ermittelt wurde. Zink verursachte hingegen nur bei pH 4,75 überhaupt eine Hemmung des Wachstums. Es sei darauf verwiesen, dass sich die in Abbildung 3.5 dargestellten Kurven für pH 6,4, von den entsprechenden Diagrammen in Abbildung 3.4 aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Testprotokolle sowohl in ihrem Verlauf als auch in der Angabe der Fehlerbalken unterscheiden.

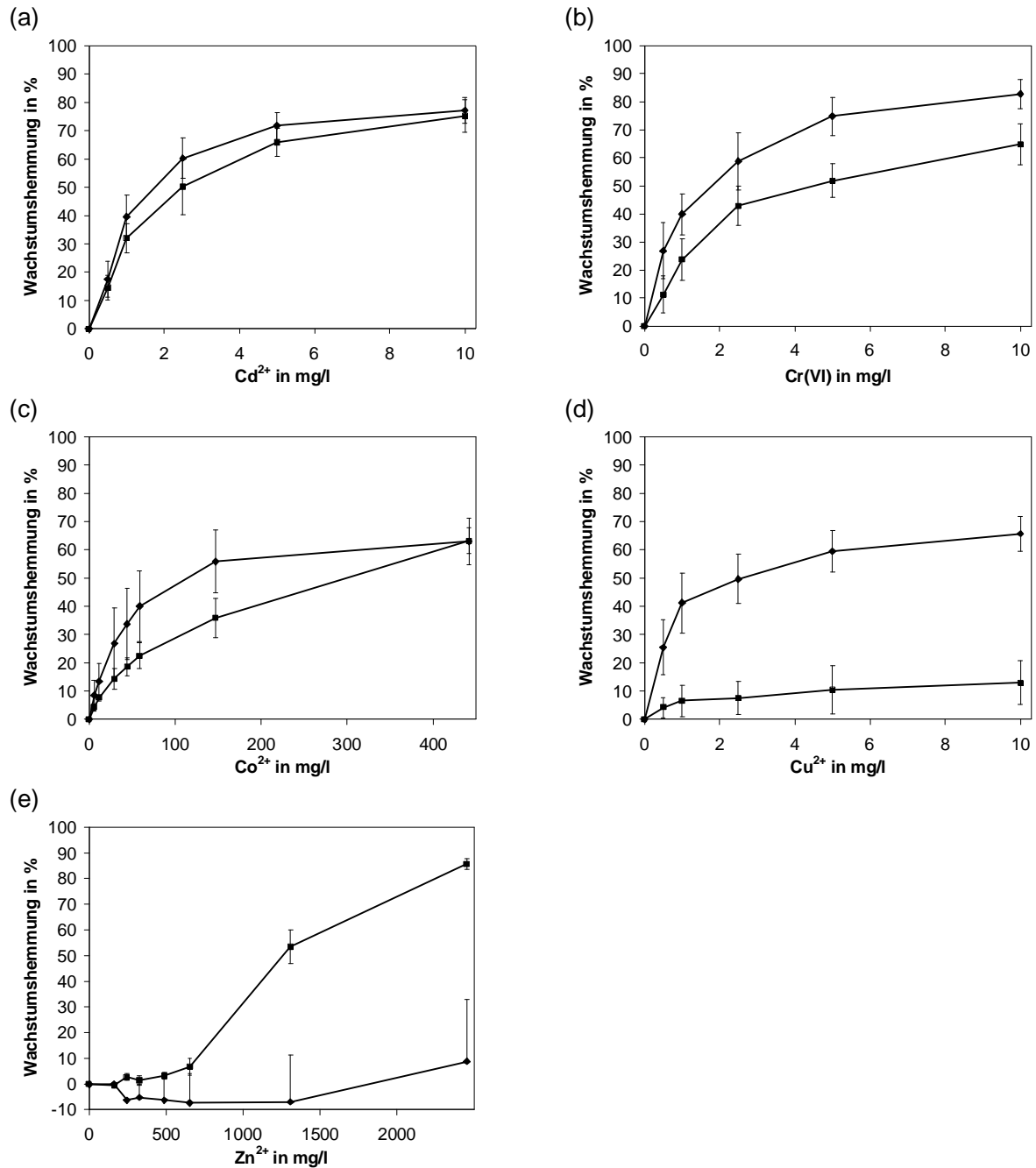
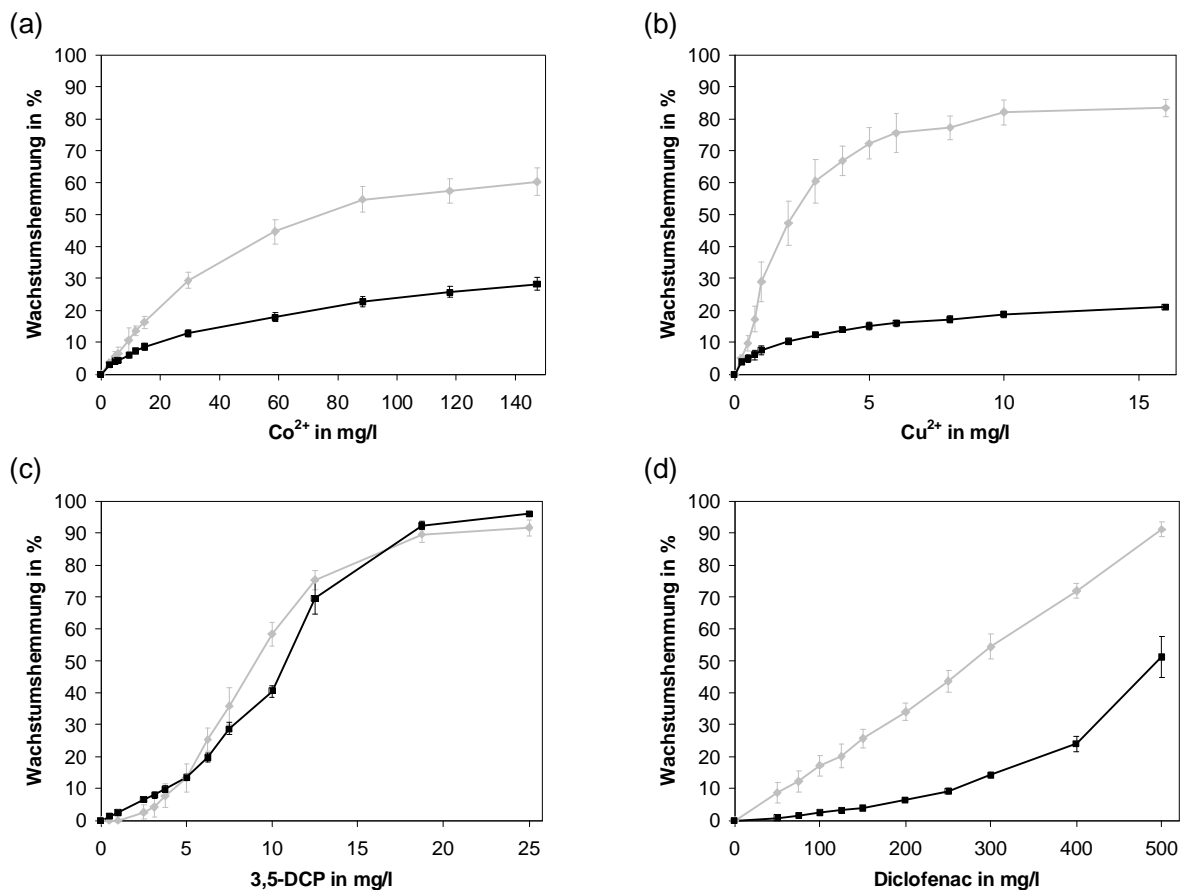


Abb. 3.5 Einfluss des pH-Wertes auf die Toxizität verschiedener Schwermetalle. Die Abbildung zeigt Konzentrations-Wirkungs-Diagramme für die Schwermetalle Cadmium (a), Chrom (b), Cobalt (c), Kupfer (d) und Zink (e) für pH 6,4 (♦) und pH 4,75 (■). Sämtliche Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm SD aus mindestens 6 verschiedenen Versuchen mit je sechs Replikaten angegeben. Die Skalierung für Diagramm (e) weicht von der der anderen Diagramme ab. Aus Gründen der Übersicht wurde in diesem Diagramm auch auf eine Darstellung der negativen Fehlerbalken für die Datenreihe pH 6,4 verzichtet.

3.3.3 Vergleich verschiedener Expositionszeiten

Es wurde der Einfluss der Expositionszeit auf die Sensitivität der Bestimmung der Cytotoxizität anhand der Verlängerung des Expositionszeitraumes von 8 h auf 24 h ermittelt. Die Ergebnisse wurden unter den in 3.3.1 erläuterten Versuchsbedingungen erzielt, wobei eine zusätzliche Messung nach 24 h erfolgte. Unter diesem Gesichtspunkt untersucht wurden Cobalt (Co^{2+}), Kupfer (Cu^{2+}), 3,5-Dichlorphenol, Diclofenac, Paracetamol, Coffein und Kochsalz (NaCl). Mit Ausnahme von 3,5-Dichlorphenol wurde für alle Substanzen eine geringere Empfindlichkeit des Verfahrens nach 24 h festgestellt (Abb. 3.6). Die prozentualen Veränderungen in der Sensitivität reichten von 0 % bei 3,5-Dichlorphenol bis zu etwa 75 % bei Cu^{2+} , bezogen auf die jeweils höchste getestete Substanzkonzentration. Dadurch war eine Berechnung von EC_{50} -Werten innerhalb des jeweilig getesteten Konzentrationsbereiches nicht mehr möglich.



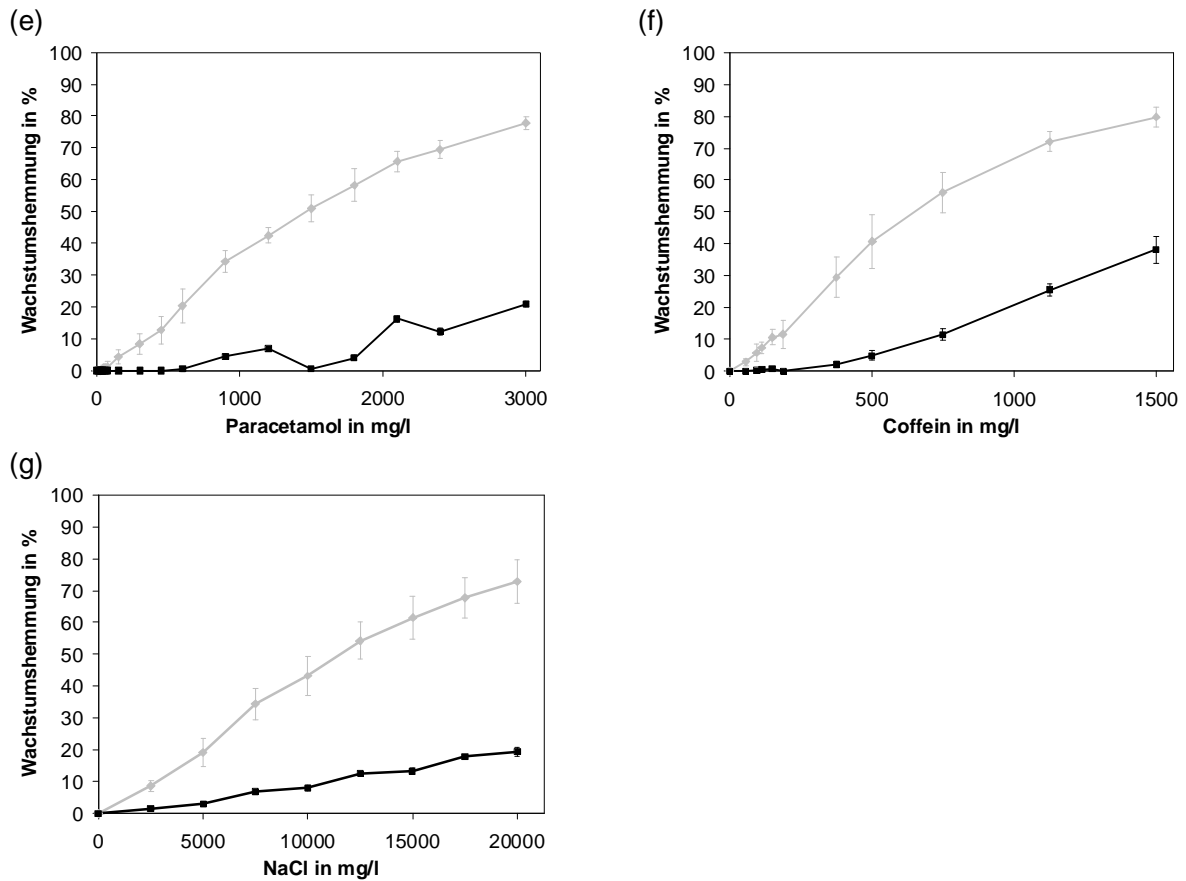


Abb. 3.6 Vergleich verschiedener Expositionszeiten. Die Abbildung zeigt Konzentrations-Wirkungs-Diagramme für Cobalt (a), Kupfer (b), 3,5-DCP (c), Diclofenac (d), Paracetamol (e), Coffein (f) und Natriumchlorid (g) für den Endpunkt 8 h (♦) und bei Messung nach 24 h (■). Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm SD aus mindestens 8 verschiedenen Versuchen mit je sechs Replikaten angegeben. Die (graufarbenen) Kurven für den Messzeitpunkt 8 h entsprechen der Darstellung in Abbildung 3.4, wurden jedoch zu besserer Vergleichbarkeit erneut dargestellt. Die Fehlerbalken einiger Datenpunkte sind kleiner als das entsprechende Symbol

3.4 Nachweise probenassoziierten gentoxischen Potenzials

3.4.1 Die Aktivität des RAD54-Promotors als Maß für gentoxische Potenziale

Für den Nachweis gentoxischer Eigenschaften wurde ein auf der Bäckerhefe *S. cerevisiae* basierendes Verfahren entwickelt, das die schadensinduzierbare transkriptionelle Aktivität des *RAD54* Promotors verwendet. Die vom *RAD54*-Gen kodierte ATPase spielt eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Schäden der DNA. Zur Herstellung des Nachweisverfahrens wurde das Gen des *grün fluoreszierenden Proteins* (GFP) aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* unter die regulatorische Kontrolle des *RAD54* Promotors gestellt (s. 3.4.2) und episomal exprimiert. Unter dem Einfluss von DNA Schäden infolge einer Exposition gentoxischer Substanzen kommt es zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität dieses Promotors, die nachfolgend mit einer erhöhten GFP-spezifischen Fluoreszenz assoziiert ist. Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen der Aktivität des Promotors und dem gentoxischen Potenzial einer Probe sowie außerdem der Konzentration einer gentoxischen Substanz. Ein mögliches gentoxisches Potenzial des Testgutes sollte also indirekt durch einen Transaktivierungstest über die Zunahme des Fluoreszenzsignals nachzuweisen sein.

3.4.2 Klonierung des Nachweiskonstruktes

Zur Konstruktion des Reporterkonstruktes für den Nachweis des gentoxischen Potenzials chemischer Verbindungen wurde die Promotorsequenz von *RAD54* (P_{RAD54}) unter Verwendung der Oligonucleotide 5'-GAGAGGGCCCTCGAGGGAAATTCGACACAAACAGC-3' und 5'-CTCT-GGATCCAGTTATAAGGAAATATATATGGTACCTTG-3' (zusätzlich eingeführte Nucleotide sind in *kursiv*, Restriktionsschnittstellen für die folgende Klonierung – *XhoI* bzw. *BamHI* – außerdem unterstrichen dargestellt) an genomischer DNA des *S. cerevisiae* Stammes FY1679-28C (Kolaczowski *et al.*, 1998) amplifiziert und mit dem für Hefe optimierten Gen des grün fluoreszierenden Proteins (yEGFP3; Cormack *et al.*, 1997) in einem 2 μ -Plasmid Derivat fusioniert (pY- $P_{RAD54-s}$ -yEGFP3). Die Sequenz des PCR Produktes wurde durch Sequenzanalyse verifiziert. Zur Herstellung des Kontrollkonstruktes, pY- $P_{RAD54-s}$ -yEGFP3 Δ , wurde die GFP-Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *EcoRI* entfernt. Die Plasmidkarten der so hergestellten Vektoren sind in Anhang A aufgeführt. Die Plasmide tragen zu Selektionszwecken *URA3*, *LEU2* und *Amp^r* Gene.

Zur Herstellung des Indikatorstammes für den Nachweis gentoxischer Effekte wurde das Nachweiskonstrukt unter Verwendung des unter 2.6.2.2 aufgeführten Protokolls in kompetente Zellen des sensitiven Stammes FYAK26/8-10B1 (siehe Tabelle 2.1) transformiert. Ebenso wurde mit dem Kontrollkonstrukt verfahren. Die hergestellten Stämme wurden jeweils mit einer Hefeplasmid-Präparation (2.5.3), anschließender Bakterientransformation (2.6.1.2), darauf folgender Bakterien Plasmid-Mini-Präparation (2.5.1) und deren Restriktionsanalyse (2.8.1) überprüft.

3.4.3 Funktionelle Charakterisierung

Zum Nachweis GFP-spezifischer Fluoreszenz wurden die Emissionsspektren der erzeugten Stämme nach einer achtstündigen Inkubation mit 0,5 mg/l 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin (MNNG) bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm aufgenommen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Die im Vergleich zu reinem Wasser erhöhte Fluoreszenz des Kontrollstammes (GFP deletiert) beruht auf der Anreicherung fluoreszierender Verbindungen in lebenden Hefezellen. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um verschiedene Aminosäuren wie Tyrosin (Anregung bei 275 nm, Emissionsmaximum bei 303 nm), Tryptophan (Anregung 287 nm, Emission 348 nm) und Phenylalanin (Anregung 260, Emission 282), aber auch um reduzierte Nikotinamide (Anregung 360-365 nm, Emission 460-470 nm) und um oxidierte Flavine (Anregung 395-440 nm, Emission 520 nm). Zellen in der stationären Wachstumsphase reichern derartige Verbindungen verstärkt an und lassen unter Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm ein breites Emissionsmaximum zwischen 505 und 540 nm erkennen, dessen Intensität sich mit zunehmendem Alter der Zellen erhöht (Daten nicht dargestellt). Die Überschneidung mit dem Emissionsmaximum von GFP (511 nm) kann die quantitative Ermittlung des spezifischen Fluoreszenzsignals beeinflussen. Zur Beurteilung derartig möglicher Beeinflussungen wurde der Kontrollstamm verwendet (hier sollte es im Vergleich zur GFP spezifischen Fluoreszenz des Teststammes zu keiner Erhöhung der gemessenen Fluoreszenz unter Einfluss der Testsubstanz kommen).

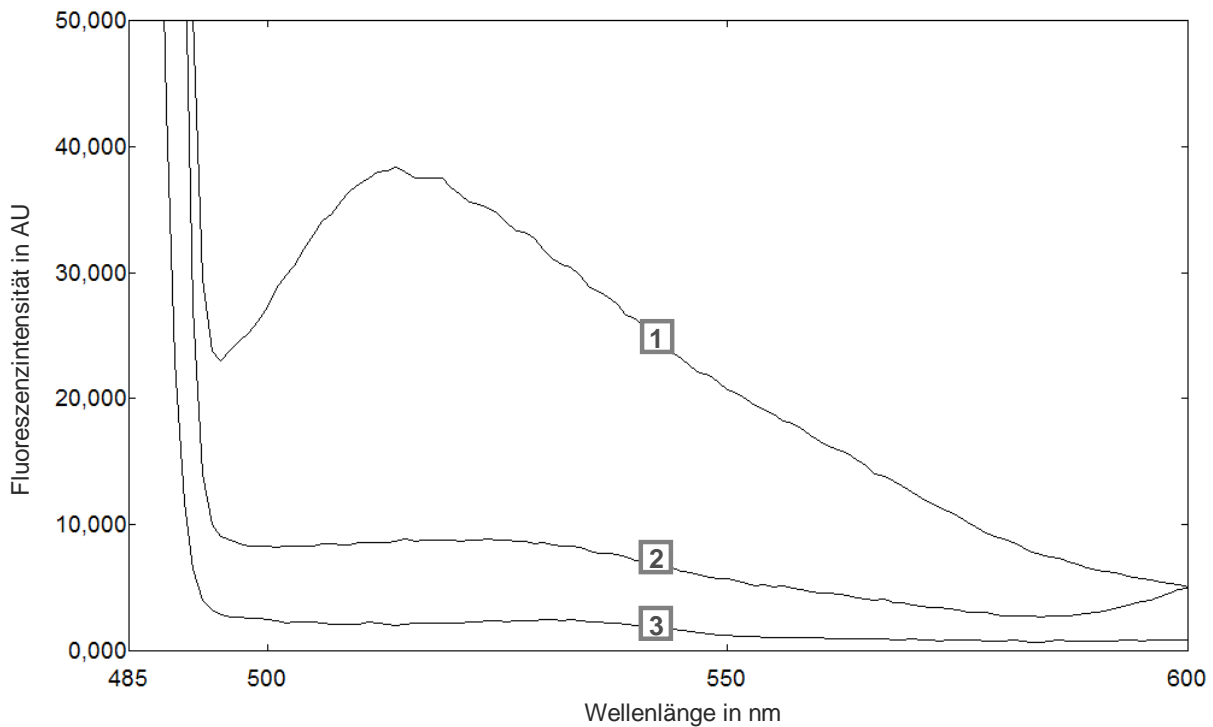


Abb. 3.7 Vergleich der Emissionsspektren von Indikator- und Kontrollstamm nach Inkubation mit MNNG als gentoxischer Referenzsubstanz (Anregung bei 485 nm). Die dargestellten Emissionsspektren wurden bei Trübungswerten von 0,4 (OD_{600}) in reinem Wasser aufgenommen. Spektrum 1 zeigt das Emissionsverhalten des Indikatorstammes nach einer achtstündigen Inkubation mit 0,5 mg/l der gentoxischen Referenzsubstanz MNNG. Das Emissionsmaximum liegt bei 511 nm (Emissionsmaximum von GFP). Ein derartiges Maximum ist für den Kontrollstamm (Spektrum 2) nicht feststellbar. Spektrum 3 gibt zu Vergleichszwecken das Fluoreszenzverhalten von reinem Wasser wider.

3.4.4 Methodische Kriterien zur Berechnung von Induktionsraten

Die Berechnung von Induktionsraten (Fluoreszenz der x-ten Verdünnungsstufe einer Probe bezogen auf die Fluoreszenz der zugehörigen Negativkontrolle) erfolgt nach Bereinigung der Fluoreszenzwerte um die korrespondierende Zellzahl (OD_{600}). Dieser Schritt ermöglicht auch den Vergleich von Fluoreszenzintensitäten unterschiedlich dicht gewachsener Ansätze. Dabei muss jedoch ausgeschlossen werden können, dass die Bereinigung um die Zellzahl an sich schon zu einer (falsch) positiven Aussage führt. Wird eine Verdünnungsreihe nicht intoxinierter Zellen hergestellt, müssen die Fluoreszenzwerte bei steigender Verdünnung im gleichen Masse abnehmen wie die entsprechenden Trübungswerte. Bei Auftragung der Fluoreszenz gegen die optische Dichte muss sich ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Größen ergeben. Die Berechnung von Induktionsraten muss bei allen Verdünnungsstufen Werte von (ungefähr) 1 ergeben. Zur Überprüfung der Proportionalität von Trübung und Fluoreszenz wurde eine Verdünnungsreihe aus einer Übernachtskultur des nicht intoxinierten Indikatorstammes hergestellt (Verdünnungsstufen: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 und 24). Die Verdünnungsstufen wurden auf eine Mikrottestplatte gegeben und diese direkt im Anschluss

ohne weitere Inkubation ausgelesen. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

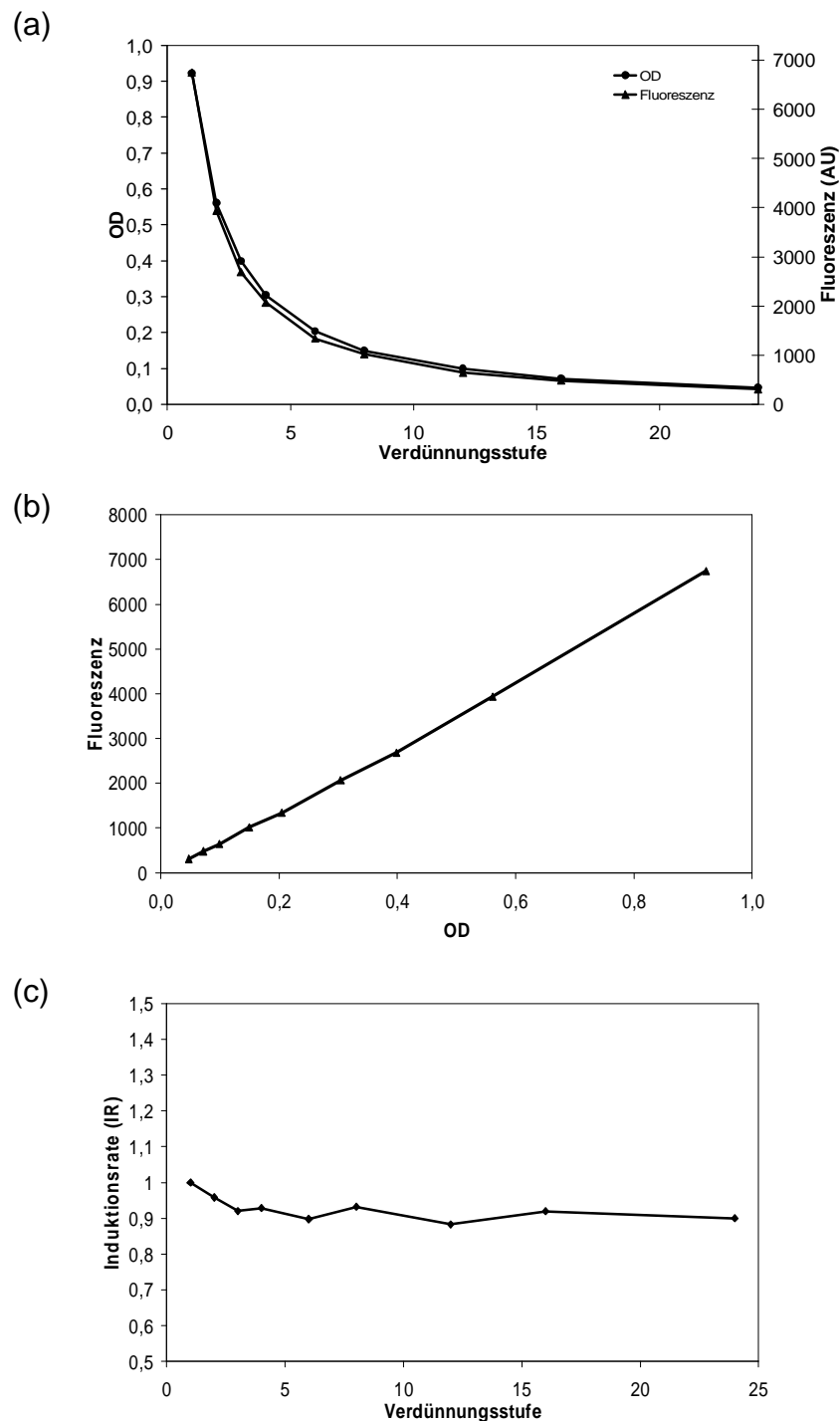


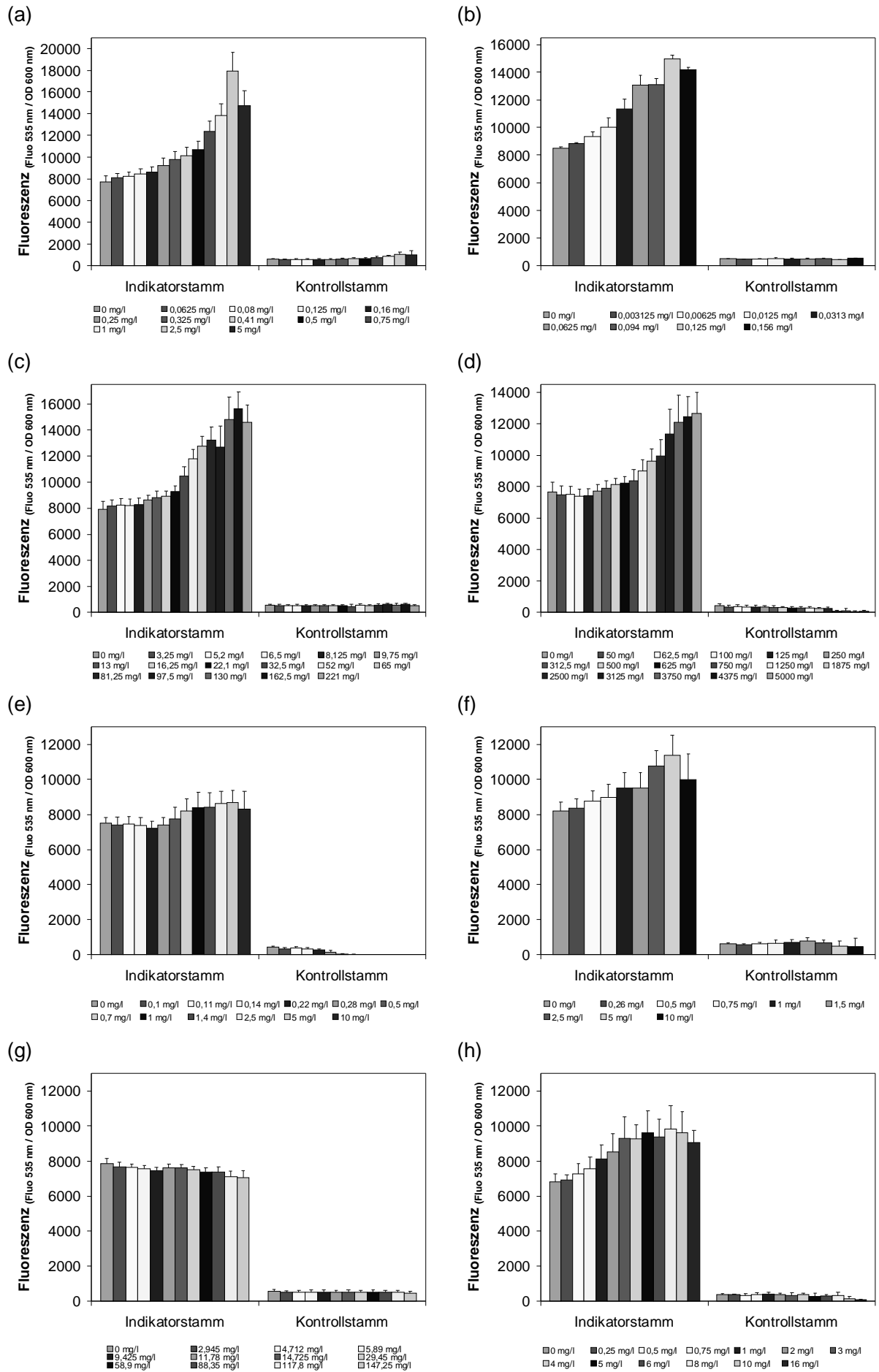
Abb. 3.8: Fluoreszenzverhalten des Indikatorstammes bei verschiedenen Verdünnungsstufen. Bei zunehmender Verdünnung der Zellsuspension nehmen Fluoreszenz- und Trübungswerte gleichermaßen ab (a). Die Auftragung der Fluoreszenzwerte gegen die korrespondierenden Trübungswerte zeigt die lineare Beziehung beider Parameter zueinander (b). Die Bereinigung der Fluoreszenzwerte um die Zellzahl ($\text{Fluoreszenz}/\text{OD}_{600}$) und der Bezug auf den entsprechenden Wert der unverdünnten Zellen (Verdünnungsstufe 1) führt bei allen Verdünnungsstufen zu Induktionsraten von ≈ 1 (c).

3.4.5 Untersuchung verschiedener Monosubstanzen

Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden einheitlich unter Verwendung der entsprechenden Arbeitsvorschrift (s. Anhang) erzielt. In Analogie zu den Experimenten zur Cytotoxizität wurden 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin (MNNG), 4-Nitroquinolin-*N*-oxid (4-NQO), Methyl-Methansulfonat (MMS) und Hydroxyharnstoff als gentoxische Referenzsubstanzen mit verschiedenen Wirkmechanismen sowie aus der Gruppe der Schwermetalle Cadmium (Cd^{2+}), Chrom (Cr(VI)), Cobalt (Co^{2+}) und Kupfer (Cu^{2+}) untersucht. Ebenfalls wurden das primär neurotoxisch wirkende Insektizid Lindan, das ZNS Stimulans Coffein und 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP) auf ein möglicherweise gentoxisches Potenzial hin untersucht. Mit dem Schmerzmittel Acetaminophen (Paracetamol) und dem Analgetikum Diclofenac wurden zwei weit verbreitete Arzneimittel mit hoher Umweltrelevanz sowie herkömmliches Kochsalz untersucht. Für das Maß des gentoxischen Potenzials wurden für alle Substanzen durch einen t-Test ermittelte *gentoxische Schwellenkonzentrationen* angegeben (Tabelle 3.2). Die Methode zur Berechnung dieser Schwellenkonzentrationen und deren Bedeutung bzw. Aussagekraft sind in der entsprechenden Arbeitsvorschrift dargelegt.

Unter allen getesteten Substanzen verursachten die gentoxischen Substanzen MNNG und 4-NQO die höchste Fluoreszenzzunahme. Für 4-NQO (Abb. 3.9 b) wurde mit 0,00625 mg/l die niedrigste (gentoxische) Schwellenkonzentration aller untersuchten Substanzen ermittelt. Mit 0,0625 mg/l wies MMNG (Abb. 3.9 a) indes ein bereits um den Faktor 10 geringeres gentoxisches Potenzial auf. Der Schwellenwert der methylierenden Substanz MMS (Abb. 3.9 c) bewegte sich mit 5,2 mg/l bereits im niedrigen Milligrammbereich. Der höchste Schwellenwert aller primär gentoxischen Substanzen wurde mit 312,5 mg/l jedoch für Hydroxyharnstoff (Abb. 3.9 d) ermittelt. Bis auf Cobalt (Abb. 3.9 g) konnten für alle getesteten Schwermetalle Schwellenwertkonzentrationen festgelegt werden. Für Chrom (Cr(VI) , Abb. 3.9 f) und Kupfer (Cu^{2+} , Abb. 3.9 h) konnten mit Schwellenkonzentrationen von jeweils 0,5 mg/l sehr hohe gentoxische Potenziale ermittelt werden, dieser Wert ist jedoch bereits um das Zehnfache höher als der für MNNG. Die Schwellenkonzentration für Cadmium (Abb. 3.9 e) lag mit 0,7 mg/l zwar in der gleichen Größenordnung, allerdings erreichte die durch Cadmium verursachte Wachstumshemmung (s. Abschnitt 3.2) bei dieser Konzentration bereits Werte von über 60 %. Damit wurde das Gültigkeitskriterium Wachstumshemmung < 50 % (s. Arbeitsvorschrift) nicht mehr erfüllt. Für Cobalt konnte keine konzentrationsabhängige Induktion des Fluoreszenzsignals innerhalb des getesteten Konzentrationsbereiches festgestellt werden, eine Schwellenwertberechnung war daher nicht möglich. Die durch 3,5-DCP (Abb. 3.9 i) verursachte Zunahme des Fluoreszenzsignals war gering und erst in einem Konzentrationsbereich feststellbar, bei dem die Wachstumshemmung über 50 % lag, und damit das Gültigkeitskriterium überschritten wurde. So lag die Wachstumshemmung bei Erreichen des

Schwellenwerts von 10,0 mg/l bei 58,4 %. Für Lindan (Abb. 3.9 j) wurden 2,2 mg/l gegenüber 75 mg/l und 300 mg/l für Diclofenac (Abb. 3.9 k) bzw. Acetaminophen (Paracetamol, Abb. 3.9 l) ermittelt. Für Coffein (Abb. 3.9 m) konnte eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals erst bei einer Konzentration von 187,5 mg/l ermittelt werden. Die höchste Schwellenwertkonzentration wurde mit 5000 mg/l für Natriumchlorid festgestellt (Abb. 3.9 n). Die Fluoreszenzentwicklung des Kontrollstammes lag bei allen Versuchen im Bereich der Hintergrundfluoreszenz des Mediums. In der Übersichtstabelle 3.2 sind die Schwellenwertkonzentrationen aller untersuchten Substanzen sowie die bei diesen Konzentrationen ermittelten Wachstumshemmwerte aufgeführt.



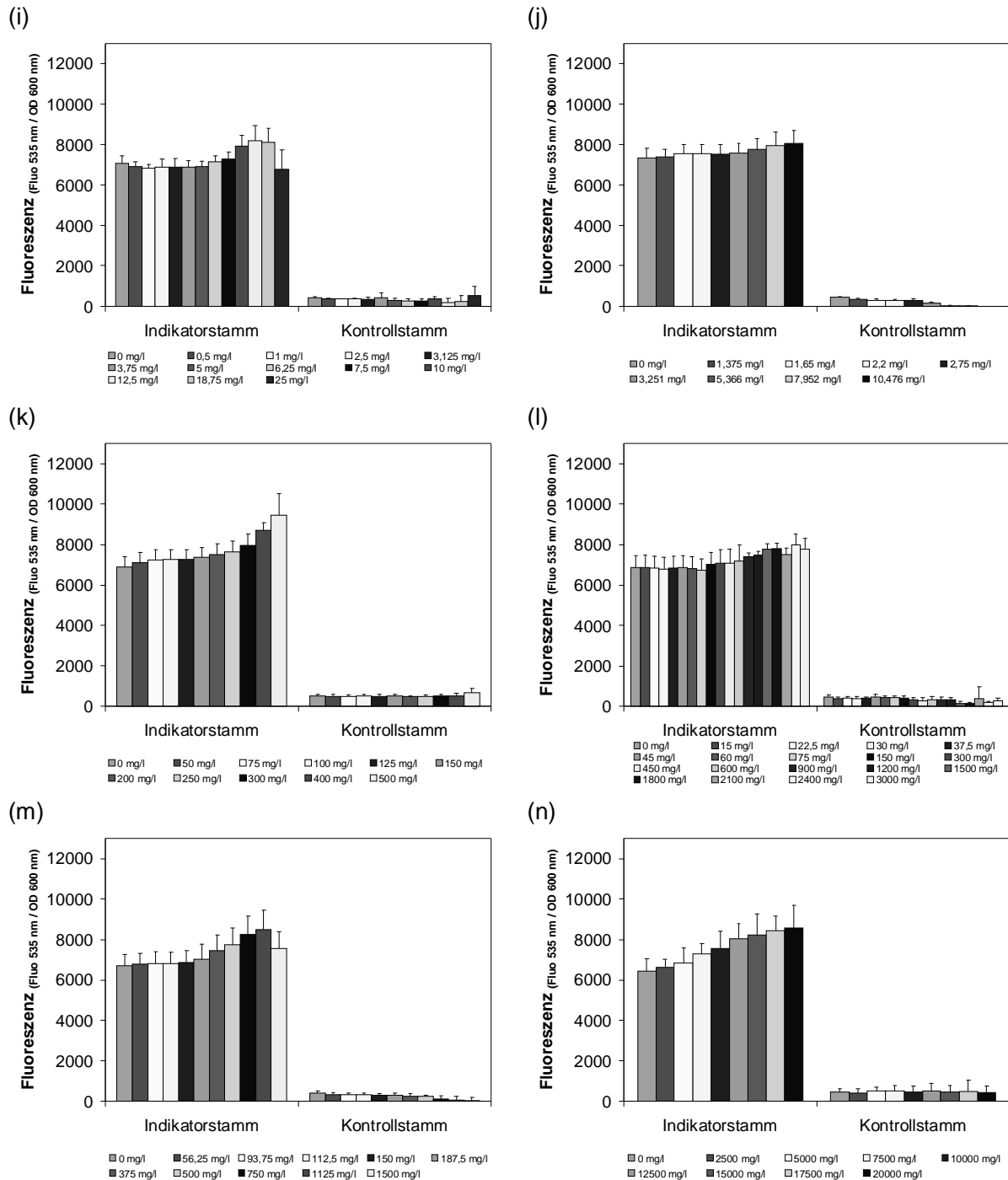
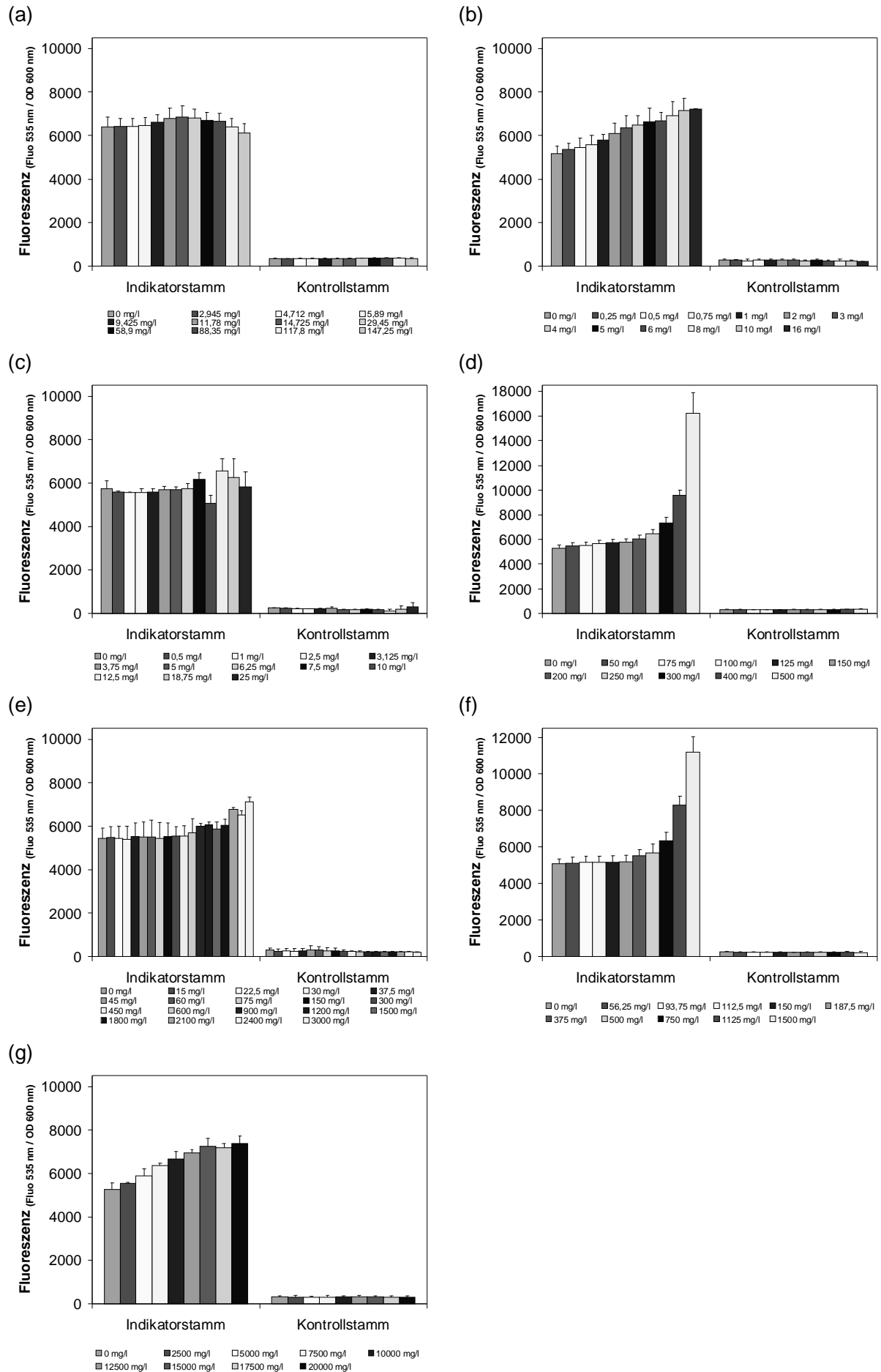


Abb. 3.9 Fluoreszenzprofile des Indikator- und des Kontrollstammes bei Gegenwart zunehmender Konzentrationen verschiedener Monosubstanzen. Die Diagramme zeigen die konzentrationsabhängige Fluoreszenzentwicklung beider Stämme unter Einwirkung von MNNG (a), 4-NQO (b), MMS (c), Hydroxyharnstoff (d), Cadmium (e), Chrom (f), Cobalt (g), Kupfer (h), 3,5-DCP (i), Lindan (j), Diclofenac (k), Paracetamol (l), Coffein (m) und Natriumchlorid (n). Dabei sind die um die Zellzahl bereinigten Fluoreszenzwerte auf der Ordinate als nennwertlose Größen angegeben. Die jeweiligen Konzentrationen in mg/l sind den zugehörigen Legenden zu entnehmen. Sämtliche Daten sind als Mittelwerte + SD angegeben ($n \geq 10$ Versuche mit je sechs Replikaten). (z. T. aus Schmitt *et al.*, 2005).

3.4.6 Vergleich verschiedener Expositionszeiten

In Analogie zu Abschnitt 3.3.3 wurde für eine Auswahl von Substanzen der Effekt einer auf 24 h erhöhten Testdauer untersucht. Die hier aufgeführten Ergebnisse wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen wie den in Abschnitt 3.4.5 erläuterten erzielt, wobei ein zusätzlicher Messzeitpunkt nach 24 h für Cobalt (Co^{2+}), Kupfer (Cu^{2+}), 3,5-DCP, Diclofenac, Paracetamol, Coffein und Kochsalz (NaCl) gewählt wurde. Im Unterschied zur Bestimmung der Cytotoxizität konnte eine Verringerung des *gentoxischen* Potenzials infolge der Verlängerung der Expositionszeit auf 24 h nicht festgestellt werden. Bei Diclofenac und Coffein (Abb. 3.10 d+f) wurde bei den jeweils höchsten getesteten Konzentrationen eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals nach 24 h festgestellt, obwohl gleichzeitig die Wachstumshemmung deutlich unter der nach achtstündiger Exposition lag (siehe Abb. 3.6). Insgesamt hatte die Erhöhung der Testzeit von 8 h auf 24 h einen nur sehr geringen Einfluss auf die Höhe der ermittelten (gentoxischen) Schwellenwertkonzentrationen (Tabelle 3.2).

Abb. 3.10 Fluoreszenzprofile des Indikator- und des Kontrollstammes bei Gegenwart zunehmender Konzentrationen verschiedener Monosubstanzen bei erweiterter Expositionsdauer. (folgende Seite). Die Diagramme zeigen die Fluoreszenzentwicklung beider Stämme unter Einwirkung von Cobalt (a), Kupfer (b), 3,5-DCP (c), Diclofenac (d), Paracetamol (e), Coffein (f) und Kochsalz (g). Dabei sind die um die Zellzahl bereinigten Fluoreszenzwerte auf der Ordinate als nennwertlose Größen angegeben. Die jeweiligen Konzentrationen in mg/l sind den zugehörigen Legenden zu entnehmen. Sämtliche Daten sind als Mittelwerte + SD angegeben ($n \geq 10$ Versuche mit je sechs Replikaten).



3.4.7 Metabolische Aktivierung durch Leberhomogenisat (S9-Aktivierung)

Viele gentoxische Substanzen wirken direkt auf die DNA ein. Eine Reihe indirekt gentoxischer Verbindungen, die so genannten *Progentoxine* sind jedoch erst als metabolisch aktivierte Derivate DNA schädigend. Derartige Umsetzungen werden durch intrazelluläre Enzyme aus der Gruppe der Cytochrom P-450 abhängigen mischfunktionellen Oxidasen katalysiert. Cytochrom-P450 Enzyme spielen allgemein bei der Biotransformation (Oxidation) und speziell der Entgiftung xenobiotischer Verbindungen in der Leber eine wichtige Rolle. Zum Beispiel erhöht die Hydroxylierung von Phenobarbital, einem Barbiturat, dessen Löslichkeit und erleichtert seine Ausscheidung, ebenso werden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe vom P450-System hydroxyliert. Prokaryotische Organismen verfügen nicht über einen derartigen Enzymapparat. Die Untersuchung indirekt gentoxischer Verbindungen mit prokaryotischen Testsystemen umfasst daher eine so genannte S9-Aktivierung dieser Substanzen mit Rattenleberhomogenisat als exogenem metabolischen Enzymzusatz. Bei der dafür verwendeten S9-Fraktion handelt es sich um den durch Zentrifugation bei 9000 x g erhaltenen Überstand eines aus Rattenlebern gewonnenen Homogenisates. Die Ratten, aus denen die Lebern entnommen werden, werden zuvor meist mit den Cytochrom P450-Induktoren Phenobarbital und β -Naphthoflavon konditioniert. *S. cerevisiae* als eukaryotischer Organismus verfügt mit Erg5p und Erg11p zwar ebenfalls über Cytochrom P450 Oxidasen. Der Umfang metabolischer Aktivierung ist aber im Vergleich zu Säugern eingeschränkt.

Um zu prüfen, inwieweit die endogene Enzymausstattung der Hefe ausreichend ist, die Toxizität von Progentoxinen nachzuweisen, und ob deren Wirkung möglicherweise (besser) nach einer S9-Aktivierung nachweisbar ist, wurden das direkt wirkende Gentoxin MNNG und das Progentoxin 2-Aminoanthracen (2-AA) mit und ohne S9-Aktivierung in *S. cerevisiae* getestet. Die Toxizität des direkt wirkenden Gentoxins sollte durch eine S9-Aktivierung nicht beeinträchtigt werden. Bei der Durchführung der S9-Aktivierung wurde in Anlehnung an die nationale Vorschrift für den *umu*-Test (DIN 38415-3 [1996]) verfahren. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.11 dargestellt.

Die Zugabe der S9-Fraktion hatte einen starken Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten der Kontrollansätze. Um eine Vergleichbarkeit mit den Werten aus den Versuchen ohne den S9-Zusatz zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse aller Ansätze um den durch die S9-Fraktion verursachten Faktor bereinigt. Es war zu beobachten, dass die durch das S9-Homogenisat verursachte Hintergrundfluoreszenz in einem signifikanten Maß über dem GFP spezifischen Fluoreszenzsignal lag und daher die Darstellung der Netto-Fluoreszenz-Zunahme beeinträchtigte. Die Fluoreszenzentwicklung unter Einfluss von MNNG ohne eine S9-Aktivierung wurde bereits in Abb. 3.9 dargestellt. Im Vergleich dazu

ist die Induktion des Fluoreszenzsignals mit S9-Aktivierung (Abb. 3.11 a) geringfügig schwächer. Das gentoxische Potenzial der direkt gentoxisch wirkenden Substanz MNNG wurde in Gegenwart der S9-Fraktion kaum beeinflusst. Die Untersuchung der indirekt gentoxischen Substanz 2-AA verursachte nur eine schwache konzentrationsabhängige Zunahme des Fluoreszenzsignals (Abb. 3.11 b), d. h. es erfolgt eine nur geringe endogene metabolische Umsetzung dieser Substanz in der Hefe. Der Zusatz des S9-Homogenisates bewirkte keine spezifische Zunahme des Fluoreszenzsignals (Abbildung 3.11 b) sondern eine weitere Abschwächung des Signals.

Allerdings wurde insgesamt ein deutlicher Einfluss auf das Wachstum festgestellt. Generell wuchsen die Zellen bei Zugabe der S9-Fraktion besser als ohne den Zusatz. Darüber hinaus wurde eine Verminderung der Wachstumshemmung festgestellt, die bei MNNG (Abb. 3.12 a) deutlich geringer ausfiel als bei 2-AA (Abb. 3.12 b), für das ein nahezu vollständiger Verlust des (cyto-)toxischen Potenzials nach S9-Aktivierung festgestellt wurde.

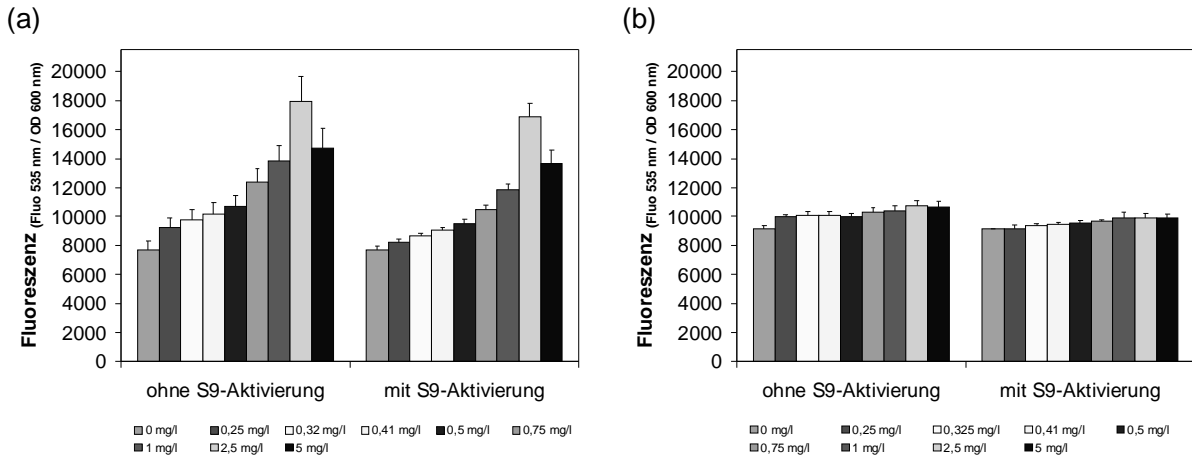


Abb. 3.11 Konzentrationsabhängige Fluoreszenzentwicklung im Indikatorstamm unter Einfluss zweier gentoxischer Referenzsubstanzen. Sämtliche Daten sind als Mittelwerte angegeben ($n = 3$ Versuche mit je sechs Replikaten). Dargestellt sind Balkendiagramme als absolute Fluoreszenzintensität bei aufsteigenden Konzentrationen (s. Legende) der direkt gentoxischen Substanz MNNG (a) und der indirekt gentoxisch wirkenden Verbindung 2-AA (b) für den Messzeitpunkt 8 h.

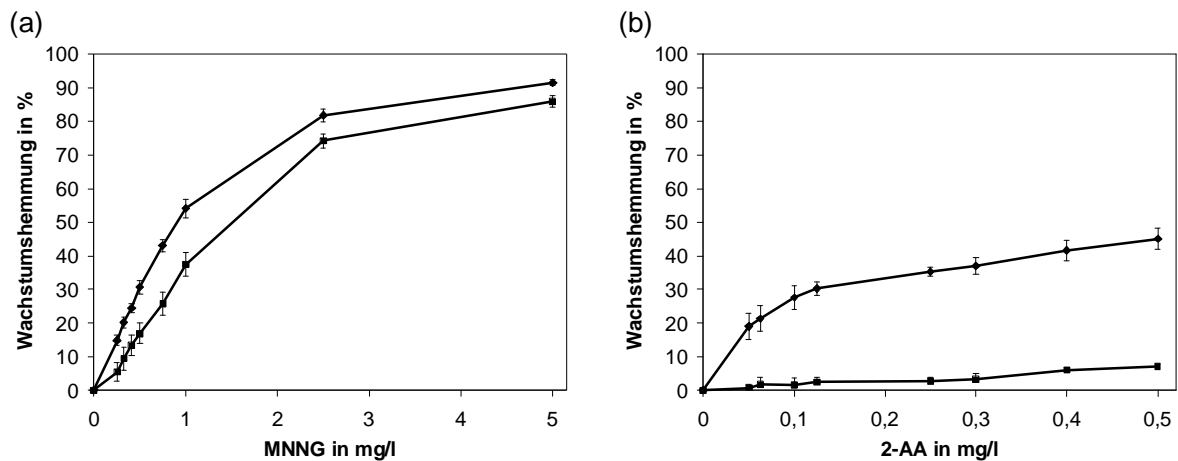


Abb. 3.12 Vergleich der durch zwei gentoxische Referenzsubstanzen verursachten Wachstumshemmungswerte ohne (◆) und mit (■) S9-Aktivierung. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben ($n = 3$ Versuche mit je sechs Replikaten). Dargestellt ist die Wachstumshemmung in Prozent (bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle) gegen aufsteigende Konzentrationen der jeweils angegebenen Substanz in mg/l für den Messzeitpunkt 8 h. Die Fehlerbalken einiger Datenpunkte sind kleiner als das entsprechende Symbol. Aus Gründen der Darstellung sind für 2-AA in der Kurve, die den Verlauf bei S9-Aktivierung angibt, nur positive Fehlerbalken dargestellt.

Ergebnisse

Tab. 3.2 Übersichtsdarstellung aller gentoxischen Schwellenwertkonzentrationen (Signifikanzniveau 95 %). Zu jedem Schwellenwert ist die bei dieser Konzentration resultierende Wachstumshemmung in Prozent angegeben. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen primär gentoxischer Wirkung (niedrige Wachstumshemmwerte bei Schwellenwert) und primär cytotoxischer Wirkung (hohe Wachstumshemmwerte bei Schwellenwert). Darüber hinaus wird ersichtlich, dass bei Verlängerung der Testzeit auf 24 h trotz nahezu unveränderter gentoxischer Schwellenwerte (Abweichung maximal eine Konzentrationsstufe) die Wachstumshemmwerte bei dieser Konzentration z. T. deutlich niedriger liegen als nach 8 h. Bei den aufgeführten Schwermetallen beziehen sich die angegebenen Konzentrationsangaben stets auf die in Klammern stehenden Ionen, nicht auf das Salz. Geordnet nach Substanzklassen.

Substanzklasse	Substanz	getesteter Konzentrationsbereich in mg/l	Zahl der getesteten Konzentrationen	8 h		24 h	
				Schwellenwert Gentox 95 % in mg/l	Wachstumshemmung bei Schwellenwert in %	Schwellenwert Gentox 95 % in mg/l	Wachstumshemmung bei Schwellenwert in %
<i>Schwermetallionen</i>	Cadmiumchlorid-1-hydrat (Cd²⁺)	0,1-10	12	0,7	60,2		
	Cobaltnitrat (Co²⁺)	2,945-147,25	11	n. d.	-	n. d.	-
	Kaliumdichromat (Cr(VI))	0,26-10	8	0,5	32,6		
	Kupfersulfat Pentahydrat (Cu²⁺)	0,25-16	12	0,5	9,7	0,5	7,86
<i>Arzneimittel</i>	Acetaminophen (Paracetamol)	15-3000	18	300	8,4	600	0,6
	Diclofenac	50-500	10	75,0	12,3	100	2,5
	Hydroxyharnstoff	50-5000	16	312,5	3,7		
<i>Pestizide</i>	Lindan	1,375-10,5	8	2,2	14,0		
<i>PCPs</i>	3,5-Dichlorphenol	0,5-25	12	10,0	58,4	12,5	69,7
<i>ZNS Stimulans</i>	Coffein	56,25-1500	10	187,5	11,6	375	2,2
Gentoxine	Methyl Methansulfonat (MMS)	3,25-221	16	5,2	4,9		
	MNNG	0,0625-5	12	0,0625	3,4		
	4-Nitroquinolin-<i>N</i>-oxid (4-NQO)	0,003125-0,156	8	0,00625	11,8		
<i>Sonstige</i>	Natriumchlorid	2500-20000	8	5000	19,1	5000	3,0

n. d.: nicht definiert

3.5 Die Untersuchung von Abwasserproben

Die Untersuchung von Abwasserproben stellt an ein Testverfahren besondere Anforderungen. Monosubstanzen können in sehr kleinen Volumina getestet werden. Von Abwasserproben hingegen müssen aufgrund der hohen Verdünnung potenziell vorhandener Schadstoffe größere Volumenanteile untersucht werden. In den meisten Fällen übersteigen die einzusetzenden Volumina das Volumen des verwendeten Nährmediums. Damit würde jedoch das Nährmedium derart stark verdünnt, dass das Wachstum der Zellen auch ohne mögliche Gifteinwirkung beeinträchtigt wäre. Um den Verdünnungseffekt auszugleichen, muss daher bei der Testung von Abwasserproben konzentriertes Nährmedium verwendet werden.

Darüber hinaus sind Abwasserproben, anders als Monosubstanzen, nicht steril. Bei Trübungsmessungen kann ein Wachstum probenbürtiger Keime zu falschen Befunden führen. Um ein derartiges Wachstum möglichst zu unterdrücken, sollte das verwendete Nährmedium möglichst an die Bedürfnisse der Hefezellen angepasst werden. Zur Untersuchung der Abwasserproben wurde das unter 2.3.2 aufgeführte Minimalnährmedium verwendet.

Die untersuchten Abwasserproben wurden durch das Landesumweltamt Nord-Rhein-Westfalen als qualifizierte Stichproben dem Ablauf eines Raffineriebetriebes entnommen. Diese industrielle Branche gehört nach der Abwasserverordnung vom 15.10.2002 zu Anhang 45, § 7a Wasserhaushaltsgesetz (WHG). Dieser Anhang gilt für Abwässer, deren Schadstofffracht im wesentlichen aus der Verarbeitung von Erdöl oder Erdölprodukten in Raffinerien stammt. Jede der drei Proben wurde in zwei anonymisierte Teilmengen aufgeteilt, so dass identische Replikate entstanden. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C. Die Herstellung der Verdünnungsreihen und die Versuchsdurchführung entsprachen den entsprechenden Arbeitsvorschriften (s. Anhang).

3.5.1 Bewertung der Ergebnisse

Cytotoxische Eigenschaften einer Probe wurden durch die von ihr verursachte Wachstumshemmung in den Testansätzen im Vergleich zu den zugehörigen Negativkontrollansätzen ermittelt. In Übereinstimmung mit den DIN-Vorschriften DIN 38 412-33 und DIN 38 412-37 wurden alle Verdünnungsstufen einer Probe in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe dann als cytotoxisch bewertet, wenn die Wachstumshemmung den Schwellenwert von 20 % überschritt. Anhand dieses Schwellenwertes wurde der zur Probe gehörende G-Wert bestimmt, nämlich als die erste Verdünnungsstufe innerhalb der aufsteigenden Verdünnungsreihe, deren Wachstumshemmung unterhalb dieses Grenzwertes lag.

Potenzielle gentoxische Eigenschaften einer Probe wurden anhand der *RAD54* vermittelten GFP Transaktivierung über das Fluoreszenzsignal detektiert. Als gentoxisch wurden die Verdünnungsstufen einer Probe bewertet, bei der die Induktion des Fluoreszenzsignals auf einem Signifikanzniveau von 95 % von der Fluoreszenzintensität in den Negativkontrollansätzen abwich (einseitiger t-Test, Wahrscheinlichkeit: 0,95). Für die Angabe des entsprechenden G-Wertes wurde die erste Verdünnungsstufe in der aufsteigenden Verdünnungsreihe bestimmt, bei der erstmals keine signifikante Erhöhung des Fluoreszenzsignals mehr festzustellen war.

Für die Bewertung der Ergebnisse bedeutet ein ermittelter G-Wert von 1,25, dass kein toxischer Effekt, bezogen auf den untersuchten Parameter, festgestellt werden konnte. Je höher der G-Wert ausfällt, desto stärker muss die Probe verdünnt werden, um ihre cyto-/gentoxische Eigenschaft aufzuheben.

Zur Ermittlung von möglichen Unterschieden zwischen den *unbehandelten* und den *zentrifugierten* Proben wurde ein t-Test mit zweiseitiger Fragestellung auf einem Signifikanzniveau von 95 % durchgeführt (Sachs, 2004). Eventuell nachweisbare (signifikante) Unterschiede ermöglichten die Schlussfolgerung, dass die Schadstoffe weniger wasserlöslich, sondern mehr adsorptiv gebunden wären.

Zur Überprüfung der (gegenseitigen) Unabhängigkeit beider untersuchten Parameter (Wachstumshemmung und Fluoreszenz) wurde ein Rang-Korrelations-Test nach Spearman durchgeführt (zweiseitig, Irrtumswahrscheinlichkeit: 0,05; Sachs 2004).

Mit Hilfe des DUNN-Testes wurde untersucht, ob es signifikante Unterschiede bezüglich der Gentoxizität zwischen den einzelnen Proben gab (Signifikanzniveau: 0,95; Sachs 2004).

Bei allen Proben konnte für die untersuchten Parameter Cytotoxizität und Gentoxizität eine positive Korrelation zwischen Verdünnungsstufe und dem Grad der Toxizität festgestellt werden. Die stärkste Reaktion wurde stets bei der niedrigsten Verdünnungsstufe von 1,25 beobachtet. Bei dieser Verdünnungsstufe lagen die Mittelwerte der durch die unbehandelten Probe verursachten Wachstumshemmung für die Proben 1, 2 und 3 bei 50,6 %, 55,9 % und bei 43,6 %. Die Hemmwerte der um etwa vier Wochen zeitlich versetzt getesteten, jeweils übereinstimmenden Proben 4 (identisch mit Probe 2), 5 (→1) und 6 (→3) wichen mit Werten von 35,6 %, 32,7 % und 31,4 % um etwa 30-35 % von den zuvor ermittelten Werten ab. Die Induktionsraten der Verdünnungsstufe 1,25 lagen bei Untersuchung der unbehandelten Proben für die Proben 1, 2 und 3 bei 1,384, 1,368 und 1,253. Im Gegensatz zur Untersuchung der Cytotoxizität zeigte sich keine zeitliche Abhängigkeit zu den Werten der Proben 4, 5 und 6 (1,368, 1,293 und 1,271).

Bei Kontrollexperimenten mit Rhein- und Leitungswasser konnten keine cyto- bzw. gentoxischen Eigenschaften nachgewiesen werden.

Die Analyse der zentrifugierten Proben ergab nahezu übereinstimmende Daten. Die durchschnittlichen Wachstumshemmwerte der Proben 1, 2 und 3 in der Verdünnungsstufe 1,25 lagen mit Werten von 50,1 %, 54,7 % und 43,2 % deutlich über den Werten der um vier Wochen zeitlich versetzt getesteten Proben 4, 5 und 6 (34,5 %, 33,3 % und 31,8 %). Bei den Analysen zur potentiellen Gentoxizität konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den zuerst getesteten Proben 1, 2 und 3 (1,378, 1,415 und 1,285) und den später analysierten Proben 4, 5 und 6 (1,489, 1,320 und 1,268) festgestellt werden. Bei beiden Parametern wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten und den zentrifugierten Proben festgestellt (t-Test). Bei den entsprechenden Kontrollexperimenten mit Rhein- und Leitungswasser wurde kein toxischer Effekt beobachtet. Die Verringerung der Wachstumshemmung bei den zeitlich versetzt analysierten Proben hatte auch einen Einfluss auf die Höhe der ermittelten G-Werte. So sank der G-Wert der Cytotoxizität für die Proben 1, 2 und 3 von dem nahezu einheitlichen Wert 3 (der Wert der unbehandelten Probe 2 lag bei zunächst 4) durch den zeitlichen Abstand um eine Verdünnungsstufe auf den Wert 2. Bei der Ermittlung der G-Werte zur Gentoxizität für die unbehandelten Gesamtproben gab es keine Abweichung zwischen den Proben. Der G-Wert für die Proben 1 und 3 war mit einem Wert von 12 identisch zum Wert der zugehörigen Vergleichsproben 5 und 6. Der G-Wert für Probe 2 und für die zugehörige Vergleichsprobe 4 lag übereinstimmend bei einem Wert von 8. Bei den zentrifugierten Proben lag der G-Wert sowohl für Probe 2 als auch für die Vergleichsprobe 4 bei 8. Bei den Proben 1 und 3 reduzierte sich der zuerst ermittelte Wert von 12 um eine Verdünnungsstufe auf einen Wert von 8 für die später untersuchten Vergleichsproben 5 und 6. Es besteht keinerlei Korrelation zwischen dem Fluoreszenzsignal und der Wachstumshemmung (Spearman Rang-Korrelations-Koeffizienten); eine erhöhte Wachstumshemmung führte demnach nicht *per se* zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals.

Die Gentoxizität sämtlicher Proben lag in der gleichen Größenordnung, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Proben konnten nicht ermittelt werden (DUNN-Test).

Die Ergebnisse der Abwasseruntersuchung sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Schmitt *et al.* (2005b) publiziert.

Ergebnisse

Tab. 3.4 Cytotoxische und gentoxische Charakterisierung der untersuchten Abwasserproben durch den *S. cerevisiae* Test (aus Schmitt *et al.*, 2005).

Probe	Datum der Untersuchung	unbehandelt								zentrifugiert							
		G-Wert				Wachstumshemmung in % bei Verdünnungsstufe 1,25				G-Wert				Wachstumshemmung in % bei Verdünnungsstufe 1,25			
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	gesamt	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Ø	Tag 1	Tag 2	Tag 3	gesamt	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Ø
1	10.-12. Dez	4	4	3	3	59,6	54,9	37,4	50,6	4	4	2	3	60,0	52,6	37,8	50,1
2	15.-17. Dez	4	4	4	4	55,9	52,5	59,2	55,9	4	3	4	3	55,0	49,5	59,7	54,7
3	21.-23. Dez	3	3	3	3	50,0	40,0	40,8	43,6	3	3	3	3	49,5	37,0	43,2	43,2
4	06.-08. Jan	2	2	2	2	39,5	37,7	29,7	35,6	2	2	2	2	37,3	38,6	27,5	34,5
5	12.-14. Jan	3	2	2	2	36,1	29,5	32,6	32,7	3	2	2	2	38,6	28,0	33,2	33,3
6	15.-19. Jan	2	2	2	2	29,1	31,8	33,3	31,4	2	2	2	2	30,5	31,9	33,0	31,8
Rheinwasser	28.-30. Jan	1,25	1,25	1,25	1,25	0	0	0	0	1,25	1,25	1,25	1,25	0,4	0	0	0
Leitungswasser	20.-22. Jan	1,25	1,25	1,25	1,25	0	0,1	0	0	1,25	1,25	1,25	1,25	0	0	1,4	0

Probe	Datum der Untersuchung	unbehandelt								zentrifugiert							
		G-Wert				Induktionsrate bei Verdünnungsstufe 1,25				G-Wert				Induktionsrate bei Verdünnungsstufe 1,25			
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	gesamt	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Ø	Tag 1	Tag 2	Tag 3	gesamt	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Ø
1	10.-12. Dez	12	16	12	12	1,439	1,425	1,289	1,384	16	16	8	12	1,375	1,466	1,293	1,378
2	15.-17. Dez	8	12	12	8	1,291	1,344	1,468	1,368	8	12	12	8	1,385	1,369	1,490	1,415
3	21.-23. Dez	12	12	16	12	1,229	1,221	1,310	1,253	16	12	12	12	1,331	1,237	1,287	1,285
4	06.-08. Jan	12	6	12	8	1,428	1,470	1,207	1,368	8	4	12	8	1,533	1,661	1,273	1,489
5	12.-14. Jan	12	8	16	12	1,229	1,373	1,278	1,293	12	8	8	8	1,265	1,397	1,299	1,320
6	15.-19. Jan	12	12	12	12	1,281	1,228	1,303	1,271	6	12	12	8	1,279	1,248	1,278	1,268
Rheinwasser	28.-30. Jan	1,25	1,25	1,25	1,25	0,962	0,974	0,965	0,967	1,25	1,25	1,25	1,25	0,995	0,969	0,997	0,987
Leitungswasser	20.-22. Jan	1,25	1,25	1,25	1,25	0,998	0,984	1,019	1,000	1,25	1,25	1,25	1,25	0,977	0,992	0,994	0,964

3.6 Die Aktivität des PMA1-Promotors als Maß für metabolische Aktivität

Zur Detektion von Substanz vermitteltem zellulären Stress und dessen Einfluss auf die metabolische Aktivität wurde ein spezifisches Nachweisverfahren entwickelt und mit Einzelstoffen getestet. Es basiert auf der transkriptionellen Aktivität des essentiellen Haushaltsgens in *S. cerevisiae*, dem *PMA1* Gen. Das Genprodukt, die Plasmamembran ATPase, spielt eine wesentliche Rolle bei der Energetisierung einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen in der Hefe, der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials und der pH Homeostase.

Zur Herstellung eines geeigneten Reporterkonstrukts wurde das Gen des *grün fluoreszierenden Proteins* (GFP) aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* unter die regulatorische Kontrolle des *PMA1* Promotors (P_{PMA1}) gestellt. Dabei wurde erwartet, dass eine Substanz vermittelte, konzentrationsabhängige Intoxinierung zu einer verminderten Transkription und/oder Inhibierung der Proteintranslation führt. In beiden Fällen wäre als Resultat die Abnahme der GFP-spezifischen Fluoreszenzentwicklung zu beobachten.

Hierbei war zu berücksichtigen, dass GFP aufgrund seiner Tertiärstruktur ein besonders stabiles Protein mit einer Halbwertszeit von etwa 7 h ist (Mateus und Avery, 2000). Diese Eigenschaft macht GFP für viele Anwendungen wie z. B. die Untersuchung von Genen mit einem sehr geringen Expressionsniveau geeignet, da hier besonders niedrige Nachweisgrenzen des verwendeten Reporters gefragt sind (Misteli und Spector, 1997). Für die Darstellung dynamischer Veränderungen, etwa abnehmender Genexpression, ist das native GFP nicht geeignet, da abnehmende Transkription durch die hohe Stabilität des GFP maskiert wird (Mateus und Avery, 2000). Sollte also eine verminderte Fluoreszenzentwicklung als Maß für eine Hemmung der *PMA1* Promotoraktivität dargestellt werden, ist die Stabilitätseigenschaft des GFP eher nachteilig. Ansatzpunkt für eine entsprechende Optimierung des Chromophors ist die Reduktion der Halbwertszeit. Mateus und Avery (2000) konnten zeigen, dass die Halbwertszeit des GFP durch das Anfügen des C-terminalen Bereichs des G₁ Cyclins aus Hefe, Cln2p, von etwa 7 h auf ungefähr 30 min reduziert wurde. Dieser 178 Aminosäuren lange Carboxyl-Terminus beinhaltet mehrere PEST-Motive, die durch einen hohen Anteil an Pro, Glu, Asp, Ser und Thr gekennzeichnet sind und als Signal-Motive für eine Ubiquitin abhängige Degradation dienen (Salama *et al.*, 1994). Cycline spielen als Zellzyklusregulatoren bei der Zellteilung eine entscheidende Rolle. Cycline werden im Zellzyklus kontinuierlich angereichert und an bestimmten Kontrollpunkten proteolytisch abgebaut. Der Abbau des G₁ Cyclins bewirkt, dass der Zelle das Überschreiten des START Kontrollpunktes und somit der Übergang von der G1 Phase in die S Phase ermöglicht wird (Lewin, 1998).

3.6.1 Klonierung des Nachweiskonstruktes pYEX-P_{PMA1}-yEGFP3/PEST

Zur analogen Fusionierung von GFP mit der PEST-Aminosäuresequenz und damit zur Reduktion der Halbwertszeit wurde zunächst der 3'-Terminus von *CLN2* durch PCR an genomischer DNA des *S. cerevisiae* Stammes PLY 232 (Bertl *et al.*, 2003) unter Verwendung der Oligonucleotide

5'-ACTGAGATCTGCATCCAACTTGAACATTTTCGAGAAAGC-3' und 5'-GAGAGAATTCCT-ATATTACTTGGGTATTGCCCATACC-3' (zusätzlich eingeführte Nucleotide sind in *kursiv*, Restriktionsschnittstellen für die folgende Klonierung – *Bgl* II bzw. *Eco*R I – außerdem unterstrichen dargestellt) amplifiziert. Als PCR-Produkt wurde ein 543 bp großes Fragment generiert. Das PCR Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Bgl* II und *Eco*R I gespalten und gerichtet mit dem 8001 bp Fragment des *Bgl* II/*Eco*R I gespaltenen Vektors pYEX-yEGFP3 (Jost Ludwig, Universität Bonn, unveröffentlicht) zum Vektor pYEX-yEGFP3/PEST ligiert. Die Sequenz des PCR Produktes wurde durch Sequenzanalyse verifiziert. Zur Herstellung des Reporterkonstruktes wurde anschließend der *CUP* Promotor im pYEX-yEGFP3/PEST Plasmid durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Pvu* II und *Msc* I entfernt (641 bp Fragment) und durch das, die vollständige *PMA1* Promotorsequenz (933 bp) enthaltende 1357 bp *Pvu* II/*Msc* I Fragment des Plasmids pYEX-P_{PMA1}-yEGFP3 ersetzt. Das resultierende Plasmid, pYEX-P_{PMA1}-yEGFP3/PEST, exprimiert ein Fusionskonstrukt aus der für Hefen optimierten Version des GFP (yEGFP3, Cormack *et al.*, 1997) mit der destabilisierenden PEST-reichen Sequenz des G1 Cyclins *CLN2* (Mateus und Avery, 2000) unter der regulatorischen Kontrolle des *PMA1* Promotors.

Die Plasmidkarten der beschriebenen Vektoren sind in Anhang A aufgeführt.

3.6.2 Funktionelle Charakterisierung des Indikatorstammes für den Nachweis der metabolischen Aktivität

Zur Herstellung des Indikatorstammes für die Bestimmung der metabolischen Aktivität wurde das in 3.6.1 beschriebene Nachweiskonstrukt unter Verwendung des unter 2.6.2.2 aufgeführten Protokolls in kompetente Zellen des sensitiven Stammes FYAK26/8-10B1 (siehe Tabelle 2.1) transformiert. Zur Kontrolle des durch die PEST-Destabilisierung des GFP verursachten Effektes wurden kompetente Zellen des gleichen Stammes mit dem unmodifizierten Konstrukt (pYEX-P_{PMA1}-yEGFP3) transformiert. Zum funktionellen Nachweis wurden die Emissionsspektren der erzeugten Stämme bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm aufgenommen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Die Fluoreszenzintensität in Zellen, die das destabilisierte Protein enthalten (Spektrum 2) ist im Ver-

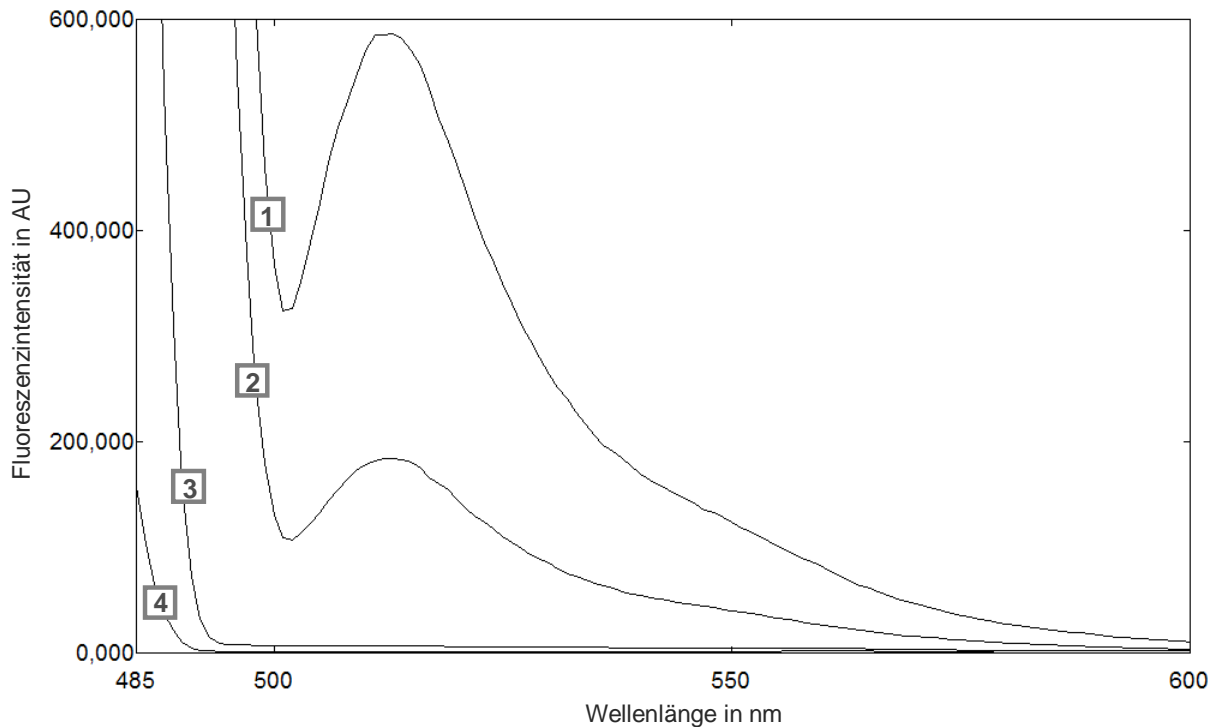


Abb. 3.13 Vergleich der Emissionsspektren. Die dargestellten Emissionsspektren wurden bei Trübungswerten von 0,4 (OD_{600}) in reinem Wasser nach Anregung bei 485 nm aufgenommen. Die Zellen wurden zuvor über Nacht bei 30 °C angezogen und das verbrauchte Medium anschließend entfernt. Spektrum 1 zeigt das Emissionsspektrum von Zellen, die die stabile Version des GFP exprimieren. Spektrum 2 wurde nach Anregung des Indikatorstammes, der das destabilisierte Protein exprimiert, aufgezeichnet. Zum Vergleich zeigt Spektrum 3 die Emission des untransformierten Stammes. Spektrum 4 gibt das Fluoreszenzverhalten von reinem Wasser wider. Die Destabilisierung des GFP durch Anfügen der PEST-Sequenz führte in den transformierten Zellen zu einem um etwa 2/3 verringerten Fluoreszenzniveau (vergl. dazu Spektrum 1 und Spektrum 2).

gleich zu Zellen mit dem stabilen Protein (Spektrum 1) deutlich niedriger, wurde jedoch mit ~200.000 *arbitrary units* (AU) als ausreichend zur Detektion spezifischer Effekte bewertet. Bei dem Ansatz zur Detektion von Substanz vermitteltem Stress und dessen Einfluss auf die metabolische Aktivität sollte die Reduktion des GFP Fluoreszenzsignals innerhalb einer Generationszeit bzw. vor Verdopplung der Zellzahl gemessen werden. Dazu wurden Indikator- und Kontrollstamm mit zunehmenden Konzentrationen der Schwermetalle Cadmium (als Cd^{2+}) und Chrom (als $Cr(VI)$) inkubiert. Für beide Schwermetalle war bereits eine signifikante Cytotoxizität nachgewiesen worden (s. 3.2.1), nun sollte ihr Einfluss auf einen wichtigen Stoffwechselvorgang der Hefe indirekt über eine Fluoreszenzabnahme untersucht werden. Die genaue Versuchsdurchführung ist der entsprechenden Arbeitsvorschrift im Anhang zu entnehmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 als Konzentrations-Wirkungs-Diagramme dargestellt. Für den Kontrollstamm mit der stabilen Version des GFP waren sowohl für Cadmium (Abb. 3.14 a) als auch für Chrom (Abb. 3.14 c) lediglich moderate Abnahmen des Fluoreszenzsignals erkennbar. Nach 7 h wurde bei Chrom teilweise sogar eine Zunahme des Fluoreszenzsignals festgestellt. Für den Indikatorstamm war für beide Substanzen jeweils

eine deutliche Hemmung des Fluoreszenzsignals (Abb. 3.14 b und d) und damit ein toxischer Effekt zu beobachten. Zur zeitlichen Abhängigkeit des Versuchsansatzes konnte festgestellt werden, dass die Hemmung der Fluoreszenzentwicklung nach 4 h Inkubation am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 3.14 b und d). Durch parallele Messung der optischen Dichte konnte festgestellt werden, dass innerhalb von vier Stunden noch keine Verdoppelung der Zellzahl erfolgt, so dass zu diesem Zeitpunkt das Kriterium *innerhalb einer Generationszeit* erfüllt war. Für Chrom wurde zwar nach 7 h eine noch deutlichere Hemmung des Signals festgestellt (Abb. 3.14 d), allerdings wird bei diesem Inkubationszeitraum das oben genannte Kriterium nicht mehr erfüllt, darüber hinaus ist das Zellwachstum bereits deutlich beeinflusst. Bei den anderen getesteten Substanzen (s. 3.5.3) wurde nach 7 h Inkubation bereits eine wieder deutlich reduzierte Hemmung der Fluoreszenz im Vergleich zu der kürzeren Versuchsdauer (3 h bzw. 4 h) festgestellt. So konnte z. B. für Kochsalz im niedrigeren Konzentrationsbereich (bis 10 g/l) sogar eine Zunahme der Fluoreszenz (Induktionsraten >1) nach 7 h und die maximale Fluoreszenzhemmung bereits nach 2 h gemessen werden.

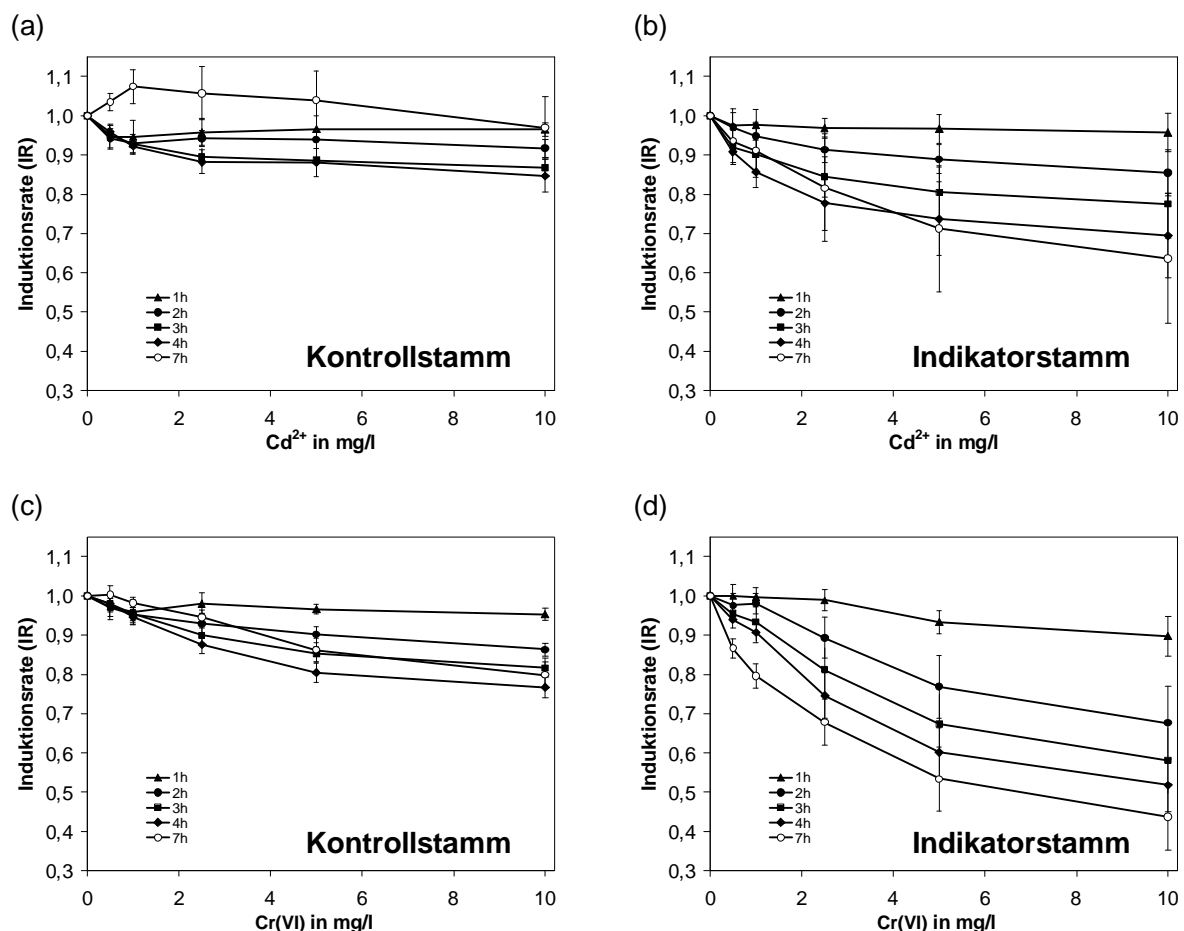
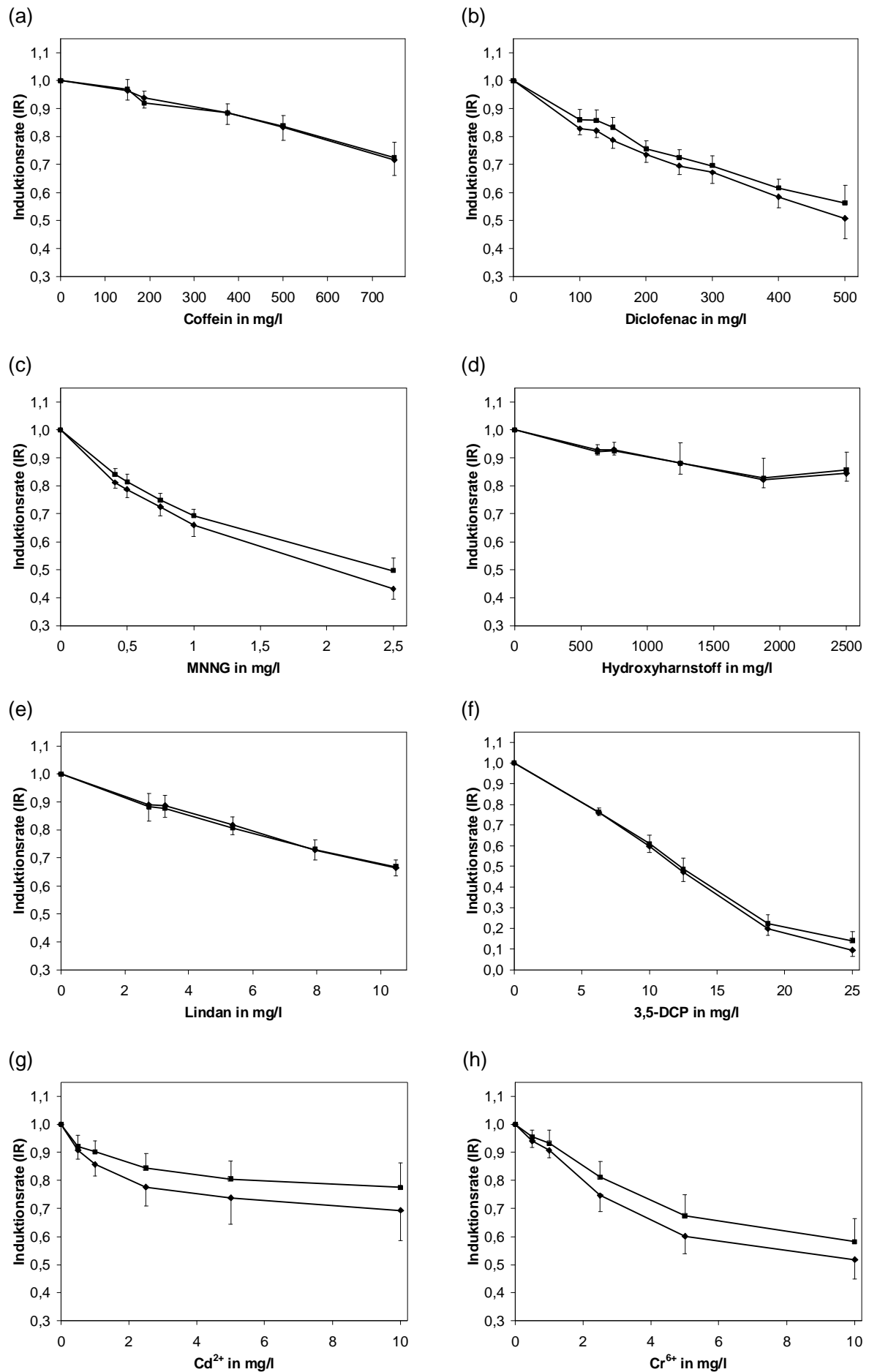


Abb. 3.14 Einfluss der Destabilisierung von GFP und des Inkubationszeitraums auf die Fluoreszenzentwicklung bei der Testung toxischer Verbindungen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD angegeben ($n \geq 10$ Versuche mit je sechs Replikaten). Dargestellt sind Konzentrations-Wirkungs-Kurven als Induktionsrate (IR, bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle) gegen aufsteigende Konzentrationen der angegebenen Substanz in mg/l für die verschiedenen Messzeitpunkte (1, 2, 3, 4 und 7 h).

3.6.3 Testung von Monosubstanzen

Zum Nachweis eines möglichen Einflusses auf die metabolische Aktivität wurden das ZNS Stimulans Coffein, das Schmerzmittel Diclofenac, die gentoxischen Substanzen Hydroxyharnstoff und 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (MNNG), das vorwiegend neurotoxisch wirkende Insektizid Lindan, das vielfach als chemisches Vorprodukt eingesetzte 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP), die Schwermetallionen Cd^{2+} , Cr(VI) , Co^{2+} und Cu^{2+} sowie Kochsalz (NaCl) getestet. Die Ergebnisse wurden als Konzentrations-Wirkungs-Diagramme (Abbildung 3.15) für die Messzeitpunkte nach 3 h (■) und 4 h (♦) Inkubation dargestellt. Zur Bewertung toxischer Effekte wurden, soweit möglich, EC_{20} - und EC_{50} -Werte inklusive der zugehörigen Vertrauensintervalle (95 %) für beide Messzeitpunkte angegeben (Tabelle 3.5). Als Bewertungsmaßstab für das toxische Potenzial einer Substanz wurde der rechnerisch ermittelt EC_{20} -Wert (Konzentration eines Stoffes, die zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität um 20 % führt) verwendet. Die Einordnung der getesteten Substanzen auf Grundlage der EC_{20} -Werte zeigte, dass MNNG (Abb. 3.15 c) mit einem Wert von 0,48 mg/l (3 h: 0,56 mg/l) das höchste toxische Potenzial aufwies. Für die zweite gentoxische Substanz, Hydroxyharnstoff (Abb. 3.15 d), konnte kein toxischer Effekt beobachtet werden. Nach MNNG zeigten die getesteten Schwermetalle, mit Ausnahme von Cobalt, das stärkste toxische Potenzial. Der niedrigste EC_{20} -Wert in der Gruppe der Schwermetalle, und damit die höchste Toxizität, wurde mit 2,0 mg/l (3 h: 2,9 mg/l) für hexavalentes Chrom (Cr(VI)), Abb. 3.15 h) ermittelt. Die EC_{20} -Werte für Cd^{2+} und Cu^{2+} (Abb. 3.15 g und j) rangierten mit Werten von 2,5 mg/l (3 h: 6,5 mg/l) respektive 2,9 mg/l (3 h: 7,0 mg/l) nahezu auf gleichem Niveau. Für Co^{2+} (Abb. 3.15 i) konnten keine Abnahme der Fluoreszenzintensität festgestellt und EC_{20} -Werte abgeleitet werden. Für Lindan (Abb. 3.15 e) wurden mit EC_{20} -Werten von 5,63 mg/l nach 4 h und 5,47 mg/l nach 3 h Inkubation Daten ermittelt, die weit jenseits des ökologisch relevanten Bereichs liegen (s. Diskussion). Unter den getesteten Substanzen bewirkte 3,5-DCP die stärkste absolute Abnahme der Fluoreszenzintensität, die Induktionsrate sank bei der höchsten für diese Substanz getesteten Konzentration auf einen Wert von etwa 0,1 (Abb. 3.15 f), was einer etwa 90%igen Hemmung entspricht. Mit dem berechneten EC_{20} -Wert von 6,27 mg/l (3 h: 6,30 mg/l) wurde 3,5-DCP im mittleren toxischen Bereich eingestuft. Für das Analgetikum Diclofenac (Abb. 3.15 b) wurde mit 140,7 mg/l (3 h: 170,6 mg/l) ein EC_{20} -Wert berechnet, der sich in der Größenordnung deutlich von den Werten der zuvor beschriebenen Substanzen abhebt. Ein noch höherer EC_{20} -Wert wurde mit 569,5 mg/l (3 h: 579 mg/l) für Coffein (Abb. 3.15 a) festgestellt. Die höchste Konzentration zur Inhibierung des Fluoreszenzsignals um 20 % wurde mit 7050 mg/l (3 h: 6200 mg/l) für Kochsalz gemessen (Abb. 3.15 k).



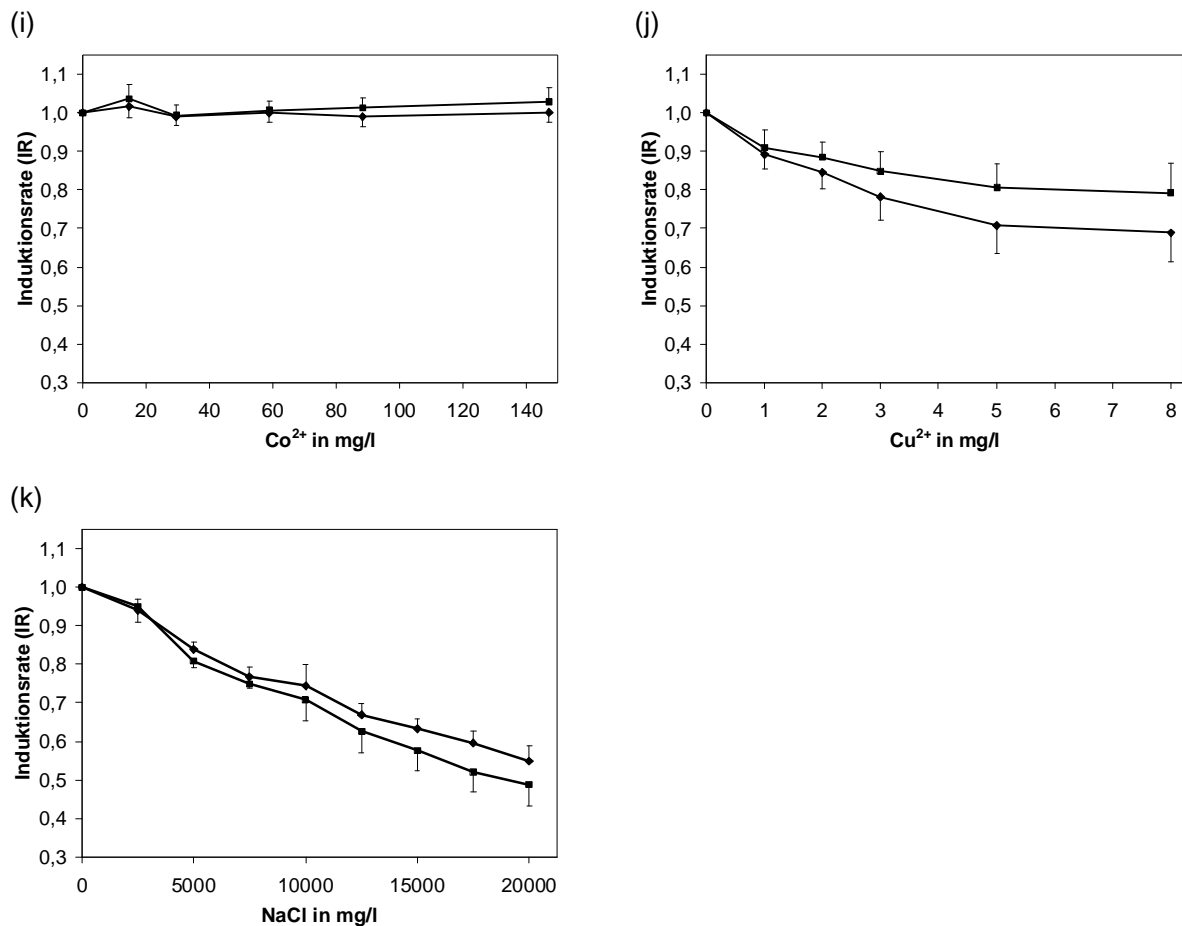


Abb. 3.15 Abnahme der Fluoreszenzintensität unter Einfluss aufsteigender Konzentrationen verschiedener Monosubstanzen. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind als Induktionsrate (IR, bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle) gegen aufsteigende Konzentrationen der jeweils angegebenen Substanz für die Messzeitpunkte 3 h (■) und 4 h (♦) dargestellt und zeigen Mittelwerte + bzw. - SD ($n \geq 10$ Versuche mit je sechs Replikaten). Die Skalierung des Diagramms für 3,5-DCP (f) weicht von der Skalierung der anderen Diagramme ab.

3.6.4 Testung von Monosubstanzen in serumhaltigem Nährmedium

Die Versuche zur Testung potenziell toxischer Substanzen in serumhaltigem Nährmedium sollten zeigen, inwieweit toxische Eigenschaften bei Verwendung von Nährmedium mit 20 %-Volumenanteilen fötalem Rinderserum (FBS) beeinflusst werden, was dem Serumanteil im humanen Vollblut entspricht. Serumbestandteile wie z. B. Proteine können toxische Substanzen binden und die Toxizität durch Reduktion der freien Verfügbarkeit beeinflussen. Unter diesen Bedingungen wurden Coffein, Diclofenac, Cu^{2+} und Natriumchlorid untersucht. Toxische Effekte konnten bei Verwendung von 20 % FBS detektiert werden, die Ergebnisse sind als Konzentrations-Wirkungs-Diagramme in Abbildung 3.16 und in Tabelle 3.5 dargestellt. Im Vergleich zur Detektion in reinem Medium (Abb. 3.15 j) wurde bei Kupferionen in serumhaltigem Nährmedium keine Fluoreszenzabnahme (Abb. 3.16 c) beobachtet.

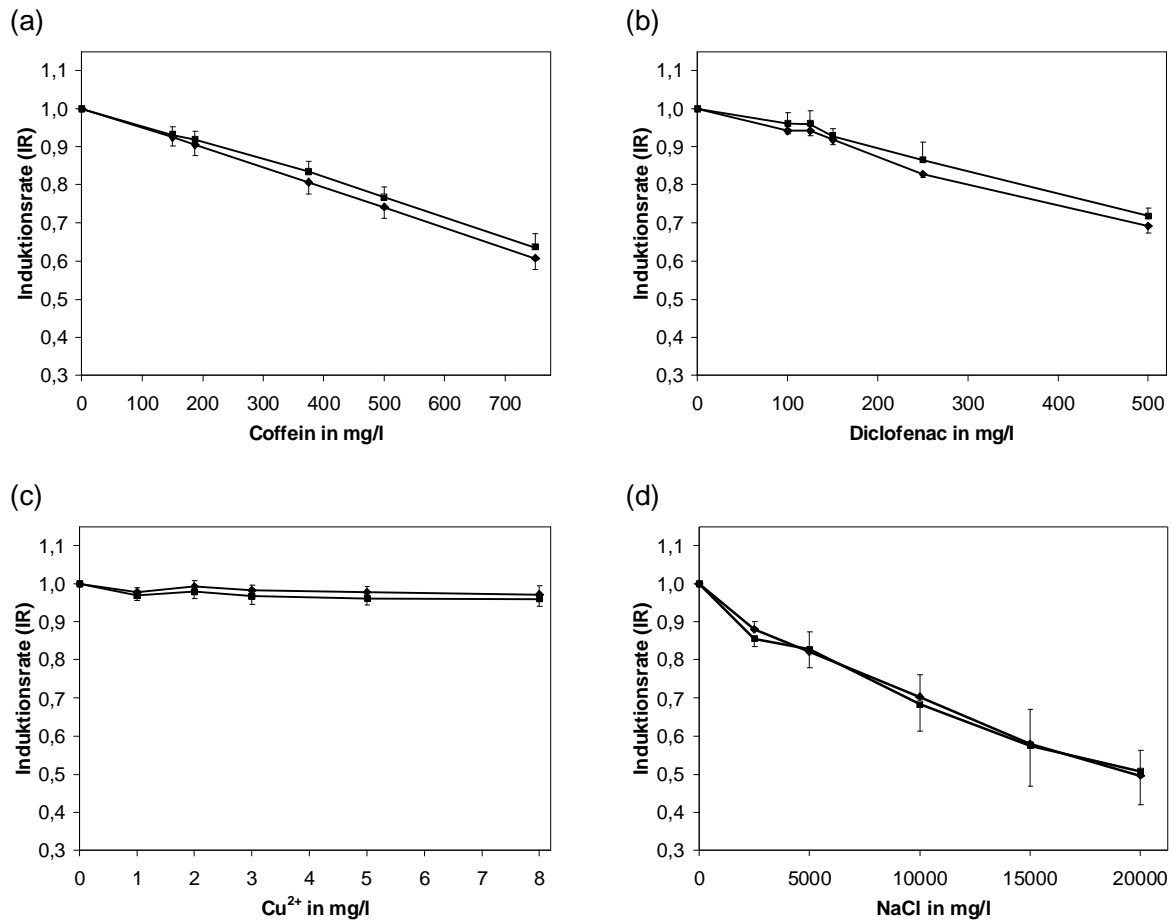


Abb. 3.16 Abnahme der Fluoreszenzintensität unter Einfluss aufsteigender Konzentrationen verschiedener Einzelstoffe in serumhaltigem (20%ig) Nährmedium. Die Daten sind als Mittelwerte + bzw. - SD angegeben ($n \geq 10$ Versuche mit je sechs Replikaten). Dargestellt sind Konzentrations-Wirkungs-Kurven als Induktionsrate (IR, bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle) gegen aufsteigende Konzentrationen der jeweils angegebenen Substanz in mg/l für die Messzeitpunkte 3 h (■) und 4 h (◆).

Dagegen war der Effekt des Rinderserums auf die Toxizität der anderen Substanzen vergleichsweise gering. Der EC_{20} -Wert von Diclofenac (Abb. 3.15 b und 3.16 b) verdoppelte sich zwar von 140,7 mg/l (3 h: 170,6 mg/l) auf 314,0 mg/l (3 h: 350,0 mg/l), das toxische Potenzial blieb aber vorhanden. Für Kochsalz wurde unter Serumeinfluss eine Verringerung des EC_{20} -Wertes von 7050 mg/l (3 h: 6200 mg/l) auf 5450 mg/l (3 h: 4838 mg/l, Abb. 3.15 k und 3.16 d) festgestellt. Dieser Effekt wurde ebenfalls für Coffein (Abb. 3.15 a und 3.16 a) beobachtet, der EC_{20} -Wert reduzierte sich von 569,5 mg/l (579,0 mg/l) auf 373,8 mg/l (417,1 mg/l). Ein Einfluss der Eigenfärbung des Rinderserums auf die beiden Messparameter Trübung und Fluoreszenz konnte nicht beobachtet werden. Die durch das Serum verursachte *Eigenfluoreszenz* lag im Bereich der Fluoreszenz des Nährmediums.

Ergebnisse

Tab. 3.5 EC-Werte zur metabolischen Aktivität mit den zugehörigen Vertrauensintervallen (95 %). Für alle Substanzen sind Daten sowohl für den Messzeitpunkt 3 h (oberer Wert) als auch für den Messzeitpunkt 4 h (unterer Wert) angegeben. EC-Werte, die in Klammern dargestellt sind, liegen außerhalb des jeweilig getesteten Konzentrationsbereiches. Bei den Schwermetallen beziehen sich die angegebenen Konzentrationsangaben stets auf die in Klammern stehenden Ionen. Geordnet nach Substanzklassen.

Substanzklasse	Substanz	getesteter Bereich in mg/l	- Serum				+ Serum			
			EC ₂₀ -Wert in mg/l	Vertrauens- intervall 95 % in mg/l	EC ₅₀ -Wert in mg/l	Vertrauens- intervall 95 % in mg/l	EC ₂₀ -Wert in mg/l	Vertrauens- intervall 95 % in mg/l	EC ₅₀ -Wert in mg/l	Vertrauens- intervall 95 % in mg/l
Schwermetallionen	Cadmiumchlorid-1-hydrat (Cd²⁺)	0,5-10,0	6,5 2,5	4,97 - 9,6 1,7 - 3,6	(205,3) (59,8)	87,3 - 813,5 26,7 - 274,9				
	Cobaltnitrat (Co²⁺)	14,73-147,3	n. d. n. d.	n. d. n. d.	n. d. n. d.	n. d. n. d.				
	Kaliumdichromat (Cr(VI))	0,5-10,0	2,9 2,0	2,3 - 3,7 1,5 - 2,6	(13,7) 9,7	9,7 - 23,3 7,0 - 15,7				
	Kupfersulfat Pentahydrat (Cu²⁺)	1,0-8,0	7,0 2,9	5,0-12,9 2,2-3,7	(173,0) (24,0)	54-2539 14,2-66,1	n. d. n. d.	n. d. n. d.	n. d. n. d.	n. d. n. d.
Arzneimittel	Diclofenac	100-500	170,6 140,7	155,3-184,9 122,9-156,7	(677,5) (585,3)	587,1-814,2 504,2-713,7	350 314	310 - 407 285 - 352	(1144) (1007)	875 - 1671 813 - 1340
	Hydroxyharnstoff	625-2500	n. d. n. d.	n. d. n. d.	n. d. n. d.	n. d. n. d.				
Pestizide	Lindan	2,75-10,48	5,47 5,63	5,16-5,79 5,02-6,27	(21,99) (21,55)	19,01-26,34 16,74-31,57				
PCPs	3,5-Dichlorphenol	6,25-25,0	6,3 6,27	5,04 - 7,35 4,97 - 7,35	11,96 11,25	10,77 - 13,20 10,04 - 12,45				
ZNS Stimulans	Coffein	150-750	579,0 569,5	431,4-1016 477,5-726,3	(2045) (1755)	1116-12993 1206-3507	417,1 373,8	368,9-473,4 335,7-414,5	(1300) (1166)	1026-1853 962-1525
Gentoxine	MNNG	0,41-2,5	0,56 0,48	0,53 - 0,58 0,44 - 0,52	(2,52) 1,98	2,37 - 2,70 1,81 - 2,20				
Sonstige	Natriumchlorid	2500-20000	6200 7050	5480-6860 6360-7710	19280 (24760)	17420-21830 21970-28750	4838 5450	2882 - 6521 4033-6728	(22656) (21582)	16219-42238 16965-31156

n. d. : nicht definiert

4 Diskussion

Zur Beurteilung des Gefährdungspotenzials chemischer Substanzen wurde in der Vergangenheit überwiegend auf tierische Modellsysteme zurückgegriffen. Vor dem Hintergrund neuer ordnungspolitischer Rahmenbedingungen wie der Europäischen Vereinbarung zur Beurteilung des Gefährdungspotenzials von Chemikalien REACH (s. Einleitung), welche eine Reduktion von Tierversuchen auf ein absolutes Minimum vorsieht, wird der steigende Bedarf an alternativen Nachweisverfahren mit hoher Aussagekraft und verlässlicher Reproduzierbarkeit deutlich. Angesichts der Fülle zu untersuchender Substanzen muss ein Testsystem darüber hinaus einen möglichst hohen Probendurchsatz ermöglichen. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines auf dem Modellorganismus Hefe basierenden Verfahrens zum Nachweis probenassoziierter Toxizität unter Berücksichtigung der Endpunkte Wachstums- hemmung, Gentoxizität und metabolische Aktivität und die Darlegung der Funktionalität der einzelnen Verfahren. In der Literatur sind gegenwärtig nur wenige hefebasierte Nachweisver- fahren beschrieben. Weber *et al.* (2000) beschrieben die Fermentationsrate der Hefe als Endpunkt für den Nachweis cytotoxischer Effekte in aquatischen Systemen. Hampsey (1991) entwickelte ein Verfahren zum direkten Nachweis von Mutationsereignissen in Hefe. Die In- duktion eines Fluoreszenzsignals zum indirekten Nachweis von DNA-Schädigungen in *S. cerevisiae* wurde durch Walmsley *et al.* (1997) und Afanassiev *et al.* (2000) publiziert. In al- len genannten Arbeiten wurden Wildtyp Zellen verwendet, ohne Berücksichtigung des Phä- nomens der multiplen Drogenresistenz (MDR). Der durch toxische Verbindungen induzierte MDR Phänotyp hat jedoch einen negativen Einfluss auf das Konzentrations- Wirkungsverhältnis einer Vielzahl chemisch und strukturell sehr unterschiedlicher Verbin- dungen und damit auf die Sensitivität des Verfahrens. In dieser Arbeit wurde zur Erhöhung der Empfindlichkeit ein sensitiver Hefestamm verwendet.

4.1 Verwendung eines sensitiven Hefestammes für den Nachweis cytotoxischer Effekte

Die Deletion der MDR-Transporter Pdr5, Snq2 und Yor1 führte zu einer signifikant erhöhten Empfindlichkeit des Testsystems gegenüber den Substanzen 4-NQO und 2-Aminoanthracen (Abb. 3.1 a+b). Die Empfindlichkeit gegenüber der ebenfalls unpolaren Substanz MNNG wur- de durch die Deletionen nicht beeinflusst (Abb. 3.1 c). Die Erhöhung der Empfindlichkeit der Hefezellen gegenüber 4-NQO ist hauptsächlich auf die Deletion des Snq2-Transporters zurückzuführen, da 4-NQO ein bekanntes Substrat dieses Transporters ist (Kolaczowski *et*

al., 1998). Bei MNNG handelt es sich offensichtlich nicht um ein Substrat der deletierten Transporter. Möglicherweise spielt dabei die im Vergleich zu 4-NQO und 2-AA nicht aromatische Struktur von MNNG eine Rolle. Eine Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber Schwermetallen wurde nicht erwartet, da deren Entgiftung über andere Mechanismen erfolgt (s. u.). Bei der Untersuchung organisch belasteter Umweltproben bietet der gentechnisch veränderte Hefestamm den Vorteil einer z. T. höheren Sensitivität. Die Empfindlichkeit der sensitiven Mutante ist bei vielen Substanzen mit der etablierter Verfahren vergleichbar oder übersteigt diese sogar (s. Anhang C). Zur Erhöhung der Sensitivität in Bezug auf Schwermetalle wären weitere genetische Manipulationen notwendig.

4.2 Wachstumshemmung zur Beurteilung cytotoxischer Eigenschaften

Der Endpunkt Wachstumshemmung ist wegen seiner hohen Relevanz der in der Ökotoxikologie am weitesten verbreitete Parameter zur Beurteilung des Gefährdungspotenzials einer Probe. Das Wachstum eines Organismus ist eine veränderliche Größe, die stets negativ auf den Einfluss toxischer Substanzen reagiert und somit Falschaussagen ausschließt.

4.2.1 Die Untersuchung verschiedener Monosubstanzen

Innerhalb der Gruppe der untersuchten Schwermetalle wurden die niedrigsten EC-Werte für Cr(VI) und Cd^{2+} ermittelt (Abb. 3.4 a+b). Die ermittelten EC_{50} -Werte von 0,8 mg/l für Cadmium und 0,88 mg/l für Chrom liegen deutlich unter Vergleichsdaten aus Untersuchungen mit *Pseudomonas fluorescens* (Cd^{2+} : 8,2 mg/l; Cr(VI): 2,2 mg/l; Paran *et al.*, 1990) und etwa im gleichen Bereich wie bei *Pseudomonas putida* (Cd^{2+} : 0,39-1,58 mg/l; Cr(VI): 2,5-4,7 mg/l; Reinke *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 1998). Auch im Vergleich zum Bakterium *Vibrio fischeri* (Cd^{2+} : 18,1-23,2 mg/l; 3,1-15,9 mg/l; Schmitz *et al.*, 1998; Gellert *et al.*, 1999; Gellert, 2000), zur Ciliatenart *Tetrahymena pyriformis* (Cd^{2+} : 4,0 mg/l; Cr(VI): 75 mg/l; Sauviant *et al.*, 1995) und zu älteren Untersuchungen mit Hefen (Cd^{2+} : 11,2-69,7 mg/l; Clemens *et al.*, 2002; Gadd *et al.*, 1986) weist das hier vorgestellte Verfahren für diese beiden Elemente eine deutlich höhere Empfindlichkeit auf. Die Toxizität von Cadmium beruht hauptsächlich auf der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Erschöpfung des zellulären Glutathion-Vorrates (Shih *et al.*, 2003; Pourahmad und O'Brien, 2000; Brennan und Schiestl, 1996; Stohs und Bagchi, 1995). Darüber hinaus hemmt Cadmium Enzyme wie die Katalase, die Mangan-Superoxyddismutase und die Kupfer/Zink-Superoxyddismutase (Casalino *et al.*, 2002).

Cadmium verursacht die Peroxidation von Lipiden, verdrängt Zink- und Selenionen aus verschiedenen Metalloenzymen und hemmt die oxidative Phosphorylierung bereits bei niedrigen Konzentrationen (Lyn Patrick, 2003).

Chrom kommt in der Umwelt in vielen verschiedenen Oxidationsstufen vor, wobei Cr(VI) und Chrom(III) die stabilsten Formen sind. Unter physiologischen Bedingungen liegt Cr(VI) hauptsächlich als Chromatanion (CrO_4^{2-}) vor, welches über Sulfat-Transporter in die Hefezelle gelangt (Cherest *et al.*, 1997). Dort unterliegt Cr(VI) einer raschen metabolischen Umsetzung zur stabilsten, trivalenten Form (Cr(III)). Bei der intrazellulären Reduktion von Cr(VI) können reaktive Metall- und Sauerstoffspezies gebildet werden, die für die Cytotoxizität dieses Elementes verantwortlich sind (Sugden und Stearns, 2000; Liu und Shi, 2001).

Das Element Cobalt (Abb. 3.4 c) und seine Verbindungen werden bei einer Vielzahl industrieller Prozesse verwendet, wie z. B. der Herstellung von Legierungen und Edelstählen. Verschiedene Cobaltsalze werden bei der Galvanisierung, als Katalysatoren und als Zusätze in Farbpigmenten eingesetzt. Als Cofaktor des Vitamins B12 und als Bestandteil mehrerer Enzyme, die an der Protein- und Nucleinsäuresynthese beteiligt sind, ist Cobalt als essentielles Spurenelement anzusehen. Die im Vergleich zu den anderen untersuchten Schwermetallen deutlich höheren *EC*-Werte sind daher auf die biologische Funktion des Elementes zurückzuführen. Im Vergleich zu den entsprechenden *EC*₅₀-Werten für *V. fischeri* (3,0 mg/l; Schmitz *et al.*, 1998) und *P. Putida* (0,98 mg/l; Schmitz *et al.*, 1998) liegt der Hefetest mit einem *EC*₅₀-Wert von 82,9 mg/l deutlich höher. Möglicherweise ist dieser Unterschied durch eine für Übergangsmetalle übliche Einlagerung in die Vakuole der Hefe zu erklären, über welche prokaryotische Organismen nicht verfügen.

Das Spurenelement Kupfer (Abb. 3.4 d) ist aufgrund seiner Eigenschaft, zwei Oxidationszustände einnehmen zu können [oxidiert: Cu(II); reduziert: (Cu(I)] ein essentieller redox Co-Faktor verschiedener Enzyme, wie zum Beispiel der Cytochromoxidase, der Cu/Zn-Superoxyddismutase und der Lysyl-Oxidase. Die gleichen Eigenschaften sind aber auch für die Toxizität von Kupfer verantwortlich, da es aufgrund kupferkatalysierter Redoxreaktionen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kommt (Labbé und Thiele, 1999). Die Trinkwasserverordnung (TrinkwV, 2000) sieht für Kupfer einen Grenzwert (als Wochenmischwert) von 2 mg/l vor. Mit dem Hefetest wurde für Cu^{2+} ein *EC*₅₀-Wert von 2,52 mg/l (*EC*₂₀: 0,74 mg/l) ermittelt und damit wäre dieser (nur) auf Basis des *EC*₂₀-Wertes zu Überwachung dieses Grenzwertes geeignet. Die Hefe ist zwar deutlich empfindlicher als *V. fischeri* mit einem *EC*₅₀-Wert von 38,7 mg/l (Schmitz *et al.*, 1998), *Tetrahymena pyriformis* (53,0 mg/l; Sauvante *et al.*, 1995) oder *Pseudomonas fluorescens* (12,7 mg/l; Torslov, 1993), jedoch weniger empfindlich als *P. putida* (0,2 mg/l, Schmitz *et al.*, 1998). In den meisten eukaryotischen Organismen wird das aufgenommene Kupfer in kupferabhängige Proteine eingebaut, so dass eine Akkumulation von freien Kupferionen bis zu gewissen Grenzen verhindert werden kann.

Prokaryoten verfügen nicht über die entsprechenden Proteine und reagieren daher bereits bei deutlich geringeren Kupferkonzentrationen. Bei einem Vergleich der Daten muss jedoch berücksichtigt werden, dass die verschiedenen Tests bei unterschiedlichen pH-Werten (*P. putida*: 7,0 [DIN EN ISO 11348-1], *P. fluorescens*: 6,8 [Paran *et al.*, 1990]) durchgeführt werden, dieser jedoch einen großen Einfluss auf die Toxizität von Kupfer hat (siehe 4.2.2).

Für die Cytotoxizität der gentoxischen Referenzsubstanz 4-NQO (Abb. 3.4 f) sind vorwiegend dessen oxidative Eigenschaften verantwortlich, da es die Bildung freier Radikale wie dem Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$), dem singulären Sauerstoff (1O_2) und dem Hydroxylradikal (HO^{\cdot}) verursacht (Ramotar *et al.*, 1998). Diese reagieren z. B. mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran. Mit einem EC_{50} -Wert von 0,0324 mg/l (EC_{20} : 0,0113 mg/l) war 4-NQO die Substanz mit dem höchsten cytotoxischen Potenzial aller untersuchten Stoffe. Cahill *et al.* (2004) ermittelten mit einer nicht sensitiven *S. cerevisiae* Mutante einen zehnfach höheren EC_{20} -Wert (0,13 mg/l). Mit *Salmonella typhimurium* wird eine 50%ige Wachstumshemmung bei etwa 0,85 mg/l erreicht (Baun *et al.*, 1999).

Die Cytotoxizität der primär gentoxischen Substanzen MNNG (Abb. 3.4 e) und MMS (Abb. 3.4 g) beruht auf einer monofunktionalen Alkylierung verschiedener Zielstrukturen. Während MNNG vorwiegend die Replikation der Chromosomen beeinträchtigt, liegt die Cytotoxizität von MMS hauptsächlich in einer Schädigung der Zellmembran begründet (Smith und Grisham, 1983). Mit dem Hefetest wurden bezüglich der cytotoxischen Wirkung deutliche Unterschiede zwischen beiden Substanzen festgestellt. Der EC_{50} -Wert für MNNG lag mit 0,9156 mg/l (EC_{20} : 0,32 mg/l) rund 60fach (auf molarer Basis etwa 80fach) unterhalb des entsprechenden Wertes für MMS (55,95 mg/l; EC_{20} : 18 mg/l). Damit übereinstimmend ermittelten Smith und Grisham (1983) für MNNG in synchronisierten 10T1/2-Zellen eine auf molarer Basis 100fach höhere Toxizität als für MMS. Der Unterschied in der Toxizität beruht vermutlich auf den unterschiedlichen Zielstrukturen. Während MNNG die DNA-Replikation und damit das Zellwachstum dauerhaft hemmt, führt MMS zu einer akuten Schädigung der Zellmembran. Überlebende Zellen proliferieren anschließend nahezu ungehemmt. Cahill *et al.* (2004) geben für ihren Hefetest EC_{20} -Werte von 16,25 mg/l für MMS und 0,57 mg/l für MNNG an und liegen damit nur bei MMS im gleichen Empfindlichkeitsbereich. In *S. typhimurium* führt eine MNNG-Konzentration von etwa 9 mg/l zu einer 50%igen Wachstumshemmung (Baun *et al.*, 1999).

Das geringste cytotoxische Potenzial aller untersuchten Gentoxine wurde mit einem EC_{50} -Wert von 3311 mg/l für Hydroxyharnstoff (Abb. 3.4 h) nachgewiesen. Anders als MNNG, 4-NQO und MMS wirkt Hydroxyharnstoff über die Hemmung eines Schlüsselenzyms der DNA-Biosynthese (Ribonucleotid-Reduktase) nur indirekt gentoxisch. Die Unterschiede in der Toxizität spiegeln die verschiedenen Wirkmechanismen wider.

Bei der Untersuchung von 3,5-Dichlorphenol (Abb. 3.4 i) wies der Hefetest mit einem errechneten EC_{50} -Wert von 9,28 mg/l eine geringere Empfindlichkeit als vergleichbare Testverfahren (Wachstumshemmtests) auf. Für *V. fischeri* wird ein EC_{50} -Wert von 2,7 mg/l angegeben (Schmitz *et al.*, 1998). Dutka und Kwan (1984) ermittelten für *P. fluorescens* einen EC_{50} -Wert von 3,2 mg/l. Auch die Algenart *Scenedesmus subspicatus* lag mit 5,32 mg/l unter dem Wert des Hefetests (Christensen und Nyholm, 1984). Die Toxizität von 3,5-Dichlorphenol beruht hauptsächlich auf der Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels durch Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung. Die vergleichsweise geringe Empfindlichkeit des Hefetests ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass *S. cerevisiae* im Unterschied zu den in den anderen Verfahren verwendeten Organismen mit der Gärung über einen zur Atmung alternativen Weg der Energiegewinnung verfügt und der Energiestoffwechsel daher weniger stark beeinträchtigt wird.

Der EC_{50} -Wert für Lindan (Abb. 3.4 j) lag bei 8,28 mg/l und damit in einem Bereich, der für eine ökologische Risikoabschätzung nicht geeignet ist. Zum Vergleich: In der Literatur werden für Invertebraten und Fische LC_{50} -Werte von 20-90 µg/l angegeben. Als ein starkes Nervengift wurde und wird Lindan als hochwirksames Insektizid eingesetzt. Die toxische Wirkung beruht vorwiegend auf einer Störung des Transports von Natrium- und Kaliumkationen am Axon der Neuronen durch eine Inhibierung der Na^+K^+ -ATPase (Ratra *et al.*, 2001; MacPhail *et al.*, 1999) und auf einer Beeinflussung des Gamma-Aminobuttersäure-Systems (GABA) durch Interaktion mit der Picrotoxin Bindestelle des GABA-A Rezeptorkomplexes im zentralen Nervensystem (Ratra *et al.*, 2001; Casida, 1993; Gant *et al.*, 1987). Dadurch erklärt sich die schwache Reaktion der Hefe auf diese Substanz, da der Einzeller über diese Zielstrukturen nicht verfügt.

In Geweben mit einem geringen Gehalt an Cytochrom-P450-Oxidasen wird Diclofenac (Abb. 3.4 k) vorwiegend über eine durch Peroxydasen katalysierte Ein-Elektron-Oxidation abgebaut, wobei freie Radikale in der Zelle entstehen können (Tafazoli *et al.*, 2005). Die Hauptursache für die Toxizität von Diclofenac ist jedoch der Abbau zu *p*-Benzoquinoniminen durch die Cytochrom-P450-Oxidase CYP2C in der Leber (Tang *et al.*, 1999). Daher ist die Toxizität von Diclofenac in Leberzellen höher als in Zellen mit einem geringen Gehalt an P450-Oxidasen (Bort *et al.*, 1998). Und so deutet die geringe Toxizität von Diclofenac in *S. cerevisiae* auf eine fehlende cytochromabhängige Metabolisierung dieser Substanz in Hefe hin.

Mit 1425 mg/l wurde für Acetaminophen (Paracetamol, Abb. 3.4 l) ein EC_{50} -Wert ermittelt, der deutlich über der therapeutisch wirksamen Plasmakonzentration von 10-20 mg/l und zehnfach über der für den Menschen toxischen Konzentration von etwa 120 mg/l liegt. Acetaminophen wird im Menschen zu verschiedenen Abbauprodukten metabolisiert, u. a. zu der hochreaktiven Verbindung *N*-acetyl-*p*-benzoquinonimin (NAPQI), für dessen Bildung die Aktivitäten verschiedener Cytochrom P450 Enzyme (CYP2E1, CYP1A2 und CYP3A4) verant-

wortlich sind. Bei therapeutischer Dosierung des Arzneimittels bildet NAPQI mit endogenem Glutathion ungiftige, ausscheidbare Konjugate; bei toxischen Dosen kommt es jedoch zu einer Erschöpfung des Glutathion-Vorrates und zur Bildung kovalenter Bindungen zwischen NAPQI und nucleophilen Makromolekülen der Zelle (Marzullo, 2005). Die marginale Toxizität in *S. cerevisiae* ist auf eine nur geringfügige metabolische Umsetzung in der Hefe zurückzuführen. Die Empfindlichkeit des Verfahrens ist höher als die von Wachstumstests mit *Escherichia coli* bzw. *Bacillus subtilis* (EC_{50} -Werte: >6000 mg/l; Clemedson *et al.*, 1996), aber deutlich niedriger als die des Kleinkrebsses *Daphnia magna* (EC_{50} : 9,2 mg/l; Parameter: Immobilisation; Kuhn *et al.*, 1989). Weitere Vergleichsdaten sind in Anhang C aufgeführt.

Das ZNS-Stimulans Coffein (Abb. 3.4 m) zeigte nur geringe toxische Eigenschaften (EC_{50} : 640,7 mg/l). Zum Vergleich: Eine Tasse herkömmlichen Filterkaffees beinhaltet je nach Zubereitung etwa 60-120 mg Coffein. Die Cytotoxizität von Coffein beruht hauptsächlich auf einer Hemmung der Phosphodiesterase, die für den Abbau von cAMP verantwortlich ist (van Staveren *et al.*, 2001). Durch die Hemmung des Enzyms erhöht sich der cAMP-Spiegel in der Zelle. Die Enzymhemmung erfolgt jedoch erst bei Konzentrationen, die (ähnlich dem mit dem Hefetest ermittelten EC_{50} -Wert) ungefähr hundertfach über den Konzentrationen liegen, die bei normalem Coffeinkonsum im Körper erreicht werden (2-10 mg/l). Vergleichswerte in der Literatur bewegen sich zwischen 117 mg/l für die Pflanze *Alium cepa* und 15426 mg/l für *E. coli* (Clemedson *et al.*, 1996). Weitere Vergleichsdaten sind in Anhang C aufgeführt.

Erhöhte Salzkonzentrationen führen zu einer Inhibierung der meisten Enzyme durch eine Beeinträchtigung der elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen, die für die Ausbildung der Proteinstruktur verantwortlich sind. Eine Vielzahl von Stoffwechselreaktionen und von Membranfunktionen wird durch hohe Salzkonzentrationen behindert. Darüber hinaus werden einige Enzyme bei weit geringeren Konzentrationen auch spezifisch durch Na^+ oder Cl^- gehemmt (Murguía *et al.*, 1996). Für Natriumchlorid (Abb. 3.4 n) wurde mit 11294 mg/l der höchste EC_{50} -Wert aller untersuchten Substanzen ermittelt. Dies stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Salztoleranz, vermittelt u. a. durch die Na-Export ATPasen Ena1-5p, überein. In Anhang C sind eine Reihe von Vergleichsdaten für diese Substanz aufgeführt. Der mit der Hefe ermittelte Wert liegt dort im mittleren Empfindlichkeitsbereich.

4.2.2 Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Toxizität von Schwermetallen

Die Wasserstoffionenkonzentration hat einen direkten Einfluss auf die Oxidationszahl und damit oft auch auf die Bioverfügbarkeit von Metallionen. So steigt die Toxizität von Eisen und Aluminium bei niedrigem pH (< 5,5) als Folge der Veränderung ihrer Oxidationszahl. Andere Metalle wie Kupfer und Cadmium hingegen werden bei niedrigen pH-Werten schlechter aufgenommen als bei neutralem pH (McDonald *et al.*, 1989). Die intrazelluläre Konzentration verschiedener Metalle (Spurenelemente) muss jedoch auch unter wechselnden Umweltbedingungen in bestimmten Bereichen gehalten werden, um sowohl Mangel- als auch (toxische) Überschusssituationen zu vermeiden. *S. cerevisiae* verfügt daher über eine Vielzahl von Mechanismen, die intrazelluläre Konzentration von Schwermetallen zu regulieren und deren toxischen Eigenschaften entgegenzuwirken. Im Gegensatz zu bakteriellen Systemen, in denen toxische Metallionen einfach aus der Zelle herausbefördert werden, werden diese in der Hefe häufig über spezielle Liganden wie Glutathion (GSH) und Metallothioneinen wie beispielsweise Cup1p sequestriert oder in Zellkompartimente wie z. B. die Vakuole eingelagert (Li *et al.*, 1997; Conklin *et al.*, 1992). Darüber hinaus verfügt aber auch *S. cerevisiae* über Efflux-Pumpen, die toxische Ionen aus der Zelle heraus befördern wie beispielsweise Cad2p (Shiraishi *et al.*, 2000; Gosh *et al.*, 1999). Die Unterschiede bei den Wachstumskurven (Abb. 3.5) lassen für die untersuchten Schwermetalle neben einer veränderten Bioverfügbarkeit auch eine Beeinflussung der zellulären Schutzmechanismen durch die externe Wasserstoffionenkonzentration vermuten.

Für Cadmium wurde bei pH 6,4 eine deutlich höhere Toxizität festgestellt als bei einem pH-Wert von 4,75. Die Aufnahme von Cadmium erfolgt in *S. cerevisiae* über die ZIP (Zinc-Iron Permease bzw. ZRT-IRT related Proteins) Transporter Zrt1p und Zrt2p (Gitan *et al.*, 1998) und über das Eisenaufnahme-System Fet4p (Dix *et al.*, 1994). Die Detoxifikation von Cadmium erfolgt über die Bindung an GSH und den anschließenden Transport der Cadmium/GSH-Komplexe in die Vakuole über den ABC-Transporter Ycf1p (Gosh *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997). Darüber hinaus wird der intrazelluläre Cadmiumspiegel durch Cad2p, einer verwandten Form der Plasmamembran P-Typ ATPase Pca1p, reguliert, womit auch Effluxmechanismen an der Detoxifikation von Cadmium beteiligt sind (Shiraishi *et al.*, 2000). Die geringere Empfindlichkeit von Hefezellen gegenüber diesem Schwermetall bei pH 4,75 stimmt gut mit Ergebnissen von Untersuchungen an Fischzellen (Kieme) überein, bei denen eine verminderte Cadmiumaufnahme bei pH 5,0 gegenüber pH 7,0 beobachtet wurde (McDonald *et al.*, 1989). Da die chemischen Eigenschaften von Cd^{2+} innerhalb des untersuchten pH-Bereiches nicht variieren, vermuteten Witters *et al.* (1998) als Ursache für die verminderte Aufnahme eine zunehmende Konkurrenz zwischen Cd^{2+} Ionen und Protonen um Transpor-

terbindestellen auf der Zelloberfläche der Kiemen. Ob dies auch Ursache für die verminderte Toxizität von Cd^{2+} bei pH 4,75 in *S. cerevisiae* ist, kann nicht abschließend geklärt werden, da die Transportmechanismen nicht bekannt sind. Zwar verfügen Zrt1p, Zrt2p und Fet4p weder über ATP-Bindestellen noch weisen sie Ähnlichkeiten mit P-Typ ATPasen auf, so dass eine Energetisierung des Transportprozesses über ATP-Hydrolyse auszuschließen ist (Zhao und Eide, 1996a+b; Dix *et al.*, 1994). Ob aber die Energetisierung über den elektrochemischen Gradienten oder über den Transmembrangradienten eines weiteren Ions erfolgt, ist z. Zt. unklar, wobei jedoch ein $\text{Me}^{2+}/\text{K}^{+}$ Antiportmechanismus auszuschließen ist (Zhao und Eide, 1996b). Ein Einfluss des Protonengradientens auf den Cad2p vermittelten Efflux ist nicht bekannt.

Auch für Cr(VI) wurde eine geringere Toxizität bei pH 4,75 festgestellt. Unter physiologischen Bedingungen liegt Cr(VI) vorwiegend als Chromatanion (CrO_4^{2-}) und nur in einem geringen Maße als Dichromatanion vor und gelangt als solches leicht über Sulfatanionen-Transporter (Sul1p und Sul2p) in die Zelle (De Flora, 2000, Cherest *et al.*, 1997). In der Zelle angelangt, wird Cr(VI) rasch in das stabile, trivalente Cr(III) umgewandelt. Möglicherweise führt die Absenkung des pH-Wertes zu einer Veränderung des Gleichgewichtes hin zu Dichromatanionen, was zu einer verminderten Aufnahme in die Zelle führen könnte.

Die Aufnahme von Zn^{2+} erfolgt in *S. cerevisiae* hauptsächlich über die Zink regulierten Transporter Zrt1p und Zrt2p (MacDiarmid *et al.*, 2000). Beide gehören zur ZIP Transporterfamilie (s. o.) und verfügen über unterschiedliche Substrataffinitäten (Zrt1p: K_m von 1 μM , Zrt2p: K_m von 10 μM , Zhao und Eide, 1996b). Darüber hinaus kann Zink auch über den Transporter für organisches Phosphat Pho84p (Jensen *et al.*, 2003) in die Zelle gelangen. Dort angelangt wird Zn^{2+} vorwiegend als prosthetische Gruppe in Metalloproteine (z. B. Zinkfingerproteine) eingebaut. Bei einem Überschuss an Zink wird dieses über die zur CDF (Cation-Diffusion-Facilitator) Familie gehörenden Transporter Zrc1p und Cot1p (sekundär aktiv über den Protonengradienten) in die Vakuole transportiert. Bei weiter steigenden Zinkkonzentrationen werden Zrt1p (>1 μM oder 65,4 $\mu\text{g/l}$) und Zrt2p (>10 μM oder 654 $\mu\text{g/l}$) verstärkt endocytisiert und anschließend in der Vakuole abgebaut (Gitan *et al.*, 1998). Unter Zinkmangelbedingungen hingegen wird die Transkription der Transportergene *ZRT1*, *ZRT2* und *ZRT3* über den Transkriptionsfaktor Zap1p erhöht, welcher an eine konservierte, 11 bp umfassende Sequenz (Zinc-Responsive Element [ZRE]) bindet (Lyons *et al.*, 2000). Der zur ZIP-Familie gehörende Transporter Zrt3p ist, anders als Zrt1p und Zrt2p, in der Vakuolenmembran lokalisiert und transportiert Zink aus der Vakuole in das Zytoplasma (MacDiarmid *et al.*, 2000). Für Zn^{2+} war bei pH 6,4 innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches keine signifikante Toxizität feststellbar. Die Empfindlichkeit der Hefe gegenüber dieser Substanz ist damit deutlich geringer als die anderer einzelliger Organismen. Diese Beobachtung wird durch Untersuchungen von Gadd *et al.* (1986) mit *S. cerevisiae* und von Clemens *et al.*

(2002) mit *S. pombe* bestätigt. Die Absenkung des pH-Wertes von 6,4 auf 4,75 führte allerdings zu einer deutlichen Erhöhung der Toxizität. Überschüssiges Zink wird in der Hefe vermutlich überwiegend in der Vakuole eingelagert, ein Kompartiment, über das prokaryotische Organismen nicht verfügen, die daher empfindlicher reagieren. Möglicherweise wird durch die Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration nicht nur die Bioverfügbarkeit von Zink sondern auch einer oder mehrere der oben beschriebenen Transportprozesse beeinflusst. In der Literatur finden sich hierzu jedoch keine Hinweise.

Cu^{2+} gelangt nach Reduktion durch die Metalloreduktasen Fre1p, Fre2p und Fre7p zu Cu^+ vorwiegend über die hochselektiven Transporter Ctr1p und Ctr3p ($K_M \sim 1\text{-}5 \mu\text{M}$) aber auch über den wenig selektiven Eisentransporter Fet4p in die Zelle (Labbé und Thiele, 1999, Li und Kaplan, 1998). Im Cytoplasma angelangt, mobilisieren die Kupfer bindenden Proteine Atx1p, Cox17p bzw. CCSp Kupfer für den Einbau in die Kupfer abhängigen Proteine Ccc2p (P-Typ ATPase des Golgiapparates), Cytochrom-Oxidase (Mitochondrien) respektive Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (Cytosol).

Unter Kupfermangelbedingungen aktiviert der Transkriptionsfaktor Mac1p die Transkription der Transportergene *CTR1*, *CTR3* und *FRE1/7*. Er bindet dabei an eine 8 bp umfassende Konsensussequenz, die als *Cu-Response Element* [CuRE] bezeichnet wird (Gross *et al.*, 2000). Bei steigenden Kupferkonzentrationen ($>K_M$) wird Mac1p aufgrund von Konformationsänderungen zunehmend von den responsiven Elementen freigesetzt (Heredia *et al.*, 2001). Darüber hinaus wird die Zahl der aktiven Transporter auf der Zelloberfläche vermutlich auch über Endocytose und Proteolyse reguliert (Labbé und Thiele, 1999). Durch Expression der Metallothioneine Cup1p und Crs5p wird überschüssiges Kupfer zusätzlich auch sequestriert. Die Untersuchung des Hefewachstums bei steigenden Kupferkonzentrationen ließ einen starken Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration erkennen. So war die Toxizität von Kupfer im sauren Milieu deutlich reduziert. Der Ladungszustand (und damit die Bioverfügbarkeit) von Kupfer ist stark pH-abhängig. So ist z. B. die Kupferaufnahme im Fisch *Salmo gairdneri* bei niedrigen pH-Werten deutlich reduziert (McDonald *et al.*, 1989). Auch in der Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* nimmt die Toxizität von Cu^{2+} mit sinkendem pH-Wert ab (de Schamphelaere *et al.*, 2003). Möglicherweise konkurrieren bei sinkendem pH-Wert Wasserstoffionen (H^+) zunehmend mit Cu^+ Ionen um Kation-Bindestellen auf der Zelloberfläche (Witters *et al.*, 1998; Cusimano und Brakke, 1986).

Die Aufnahme von Cobalt in *S. cerevisiae* erfolgt über den Eisen-Transporter Fet4p (Dix *et al.*, 1994), den Magnesium-Transporter Alr1p (Graschopf *et al.*, 2001), den Transporter für anorganisches Phosphat Pho84p (Jensen *et al.*, 2003) und unter Beteiligung von Grr1p (COT2), einem für die Glucose-Repression benötigten Enzym, das selbst jedoch nicht für den Transport der Ionen verantwortlich ist, da es über keine Transmembrandomänen verfügt (Conklin *et al.*, 1993). *In vivo* ist die Bioverfügbarkeit von Co^{2+} Ionen relativ begrenzt, da die-

se an Proteine binden und bei physiologischen Phosphatkonzentrationen (K_{sp} $2,5 \times 10^{-35}$ bei 25 °C) ausfallen (Lison *et al.*, 2001). Die Detoxifikation von Co^{2+} erfolgt über die Induktion der Expression des Metallothioneingens *CUP1* (Tohoyama *et al.*, 2001) und des Transportergens *COT1* (Conklin *et al.*, 1992), welches in der Vakuole lokalisiert ist und daher eine Funktion bei der intrazellulären Sequestrierung dieses Elementes nahe legt (Li und Kaplan, 1998). Die verringerte Toxizität von Cobalt bei pH 4,75 ist auf ähnliche Ursachen wie bei den anderen Metallen (außer Zink) zurückzuführen.

Zusammenfassend konnte ein z. T. deutlicher Einfluss des pH-Wertes auf die Toxizität festgestellt werden. Die angestellten Beobachtungen entsprechen dabei den Angaben in der Literatur. Das Verfahren liefert auch bei einem pH-Wert von 4,75 zuverlässige Ergebnisse und ist daher geeignet, verschiedene Umweltbedingungen nachzustellen.

4.2.3 Vergleich verschiedener Expositionszeiten

Die Erhöhung der Inkubationszeit von 8 h auf 24 führte zu einer deutlich verringerten Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens (Abb. 3.6). Verschiedene Ursachen könnten für dieses Phänomen verantwortlich sein. Bei den untersuchten Schwermetallen könnte es über die in 4.2.2 beschriebenen Detoxifikationsmechanismen zu einer im Zeitverlauf zunehmenden Adaptation der Zellen kommen. Bei den organischen Verbindungen könnte eine mögliche metabolische Umsetzung zu einer Konzentrationsabsenkung der toxisch wirksamen Substanz über den Zeitverlauf führen. Andere Substanzen sind temperaturempfindlich und zerfallen unabhängig und qualitativ unterschiedlich von einer metabolischen Umsetzung in Derivate. Bei der Untersuchung der Toxizität von 3,5-DCP jedoch wurde kein Einfluss der Expositionsdauer festgestellt. Bei 3,5-DCP handelt es sich um eine unter den gegebenen Versuchsbedingungen stabile Verbindung. Ein möglicher metabolischer Abbau bzw. Detoxifikationsmechanismen in der Hefe sind in der Literatur gegenwärtig nicht beschrieben. Nach den vorliegenden Ergebnissen erfolgt keine Adaptation der Hefezellen.

Eine weitere Ursache für die geringere Empfindlichkeit des Verfahrens nach 24 h ist im Wachstum der Hefe und dem gewählten Auswerteverfahren begründet. Da das Wachstum in den Negativkontrollansätzen nicht durch die Einwirkung toxischer Verbindungen beeinträchtigt wird, erreichen die Zellen in diesen Ansätzen als erstes die stationäre Phase, in der es zur Anreicherung (toxischer) Stoffwechselendprodukte kommt und die Nährstoffe des Mediums nahezu erschöpft sind. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führt in diesen Ansätzen deshalb zu keiner weiteren nennenswerten Erhöhung der Zellzahl, wohl aber bei den deutlich langsamer wachsenden Zellen der verschiedenen Testansätze, was zu einer Angleichung der Zellzahl führen kann (s. Abb. 4.1), wodurch das toxische Potenzial der Probe zu-

nehmend maskiert wird. Allerdings scheint dieser Effekt bei 3,5-DCP keine Rolle zu spielen. Möglicherweise verzögert 3,5-DCP nicht nur das Wachstum der Zellen, sondern begrenzt durch den direkten Einfluss auf den Energiestoffwechsel (was mit einer ineffizienteren Nutzung der zur Verfügung gestellten [begrenzten] Energiequelle [Glucose] verbunden ist) auch die maximal erreichbare Zellzahl.

Darüber hinaus gibt die gewählte Methode der Endpunktmessung keine Auskunft über den genauen Verlauf der Wachstumskurven, sondern stellt lediglich eine Momentaufnahme zum

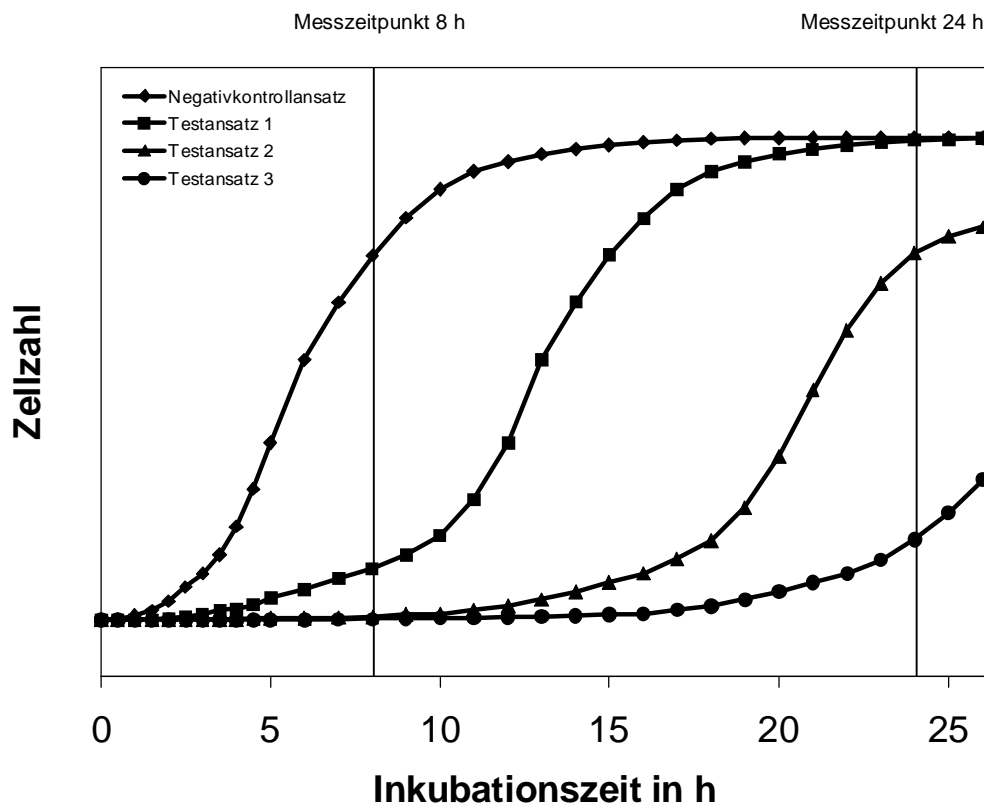


Abb. 4.1 Typischer Verlauf von Wachstumskurven bei steigenden Substanzkonzentrationen. Abhängig von der Wahl des Endpunktes ergeben sich unterschiedliche Werte für die prozentuale Hemmung des Zellwachstums.

Messzeitpunkt dar. Dieser Effekt könnte durch die Berechnung der Fläche (Integrale) unter den Wachstumskurven Berücksichtigung finden. Das würde jedoch die Aufnahme einer Wachstumskinetik voraussetzen.

Zugunsten der Empfindlichkeit sollte die Inkubationsdauer bei 8 h liegen. Durch die Erweiterung der Inkubationsdauer auf arbeitstechnisch günstigere 24 h verliert das Verfahren deutlich an Empfindlichkeit.

4.2.4 Schlussfolgerungen

Der entwickelte Wachstumstest mit *S. cerevisiae* ermöglicht den sicheren und reproduzierbaren Nachweis des cytotoxischen Potenzials von Monosubstanzen. Der Vergleich der Resultate mit denen anderer Wachstumstests zeigt die hohe Empfindlichkeit der verwendeten Hefe (s. Anhang C). Aufgrund des sich ähnelnden Zellaufbaus und ähnlicher Stoffwechselwege von Hefe und höheren Eukaryoten sind die erzielten Ergebnisse möglicherweise besser zur Bewertung des toxischen Potenzials einer Probe für die Tierwelt geeignet als die Ergebnisse prokaryotischer Systeme.

Darüber hinaus ermöglicht der Hefetest, anders als andere Verfahren, die Untersuchung von Proben bei unterschiedlichen pH-Werten. Der pH-Wert des Nährmediums hat zum Teil erheblichen Einfluss auf die Toxizität einiger Substanzen.

Der verwendete Organismus ist leicht kultivier- und handhabbar. Durch Automatisierung des Verfahrens ist die gleichzeitige Untersuchung einer hohen Zahl an Proben möglich. So erweitert der *S. cerevisiae* Wachstumstest die Palette der in der Umwelttoxikologie zur Verfügung stehenden Verfahren zur Beurteilung des cytotoxischen Potenzials von Einzelstoffen um einen aussagekräftigen, verlässlichen und kostengünstigen Bioassay.

4.3 Entwicklung eines auf Hefe basierenden Verfahrens zum Nachweis probenassozierten gentoxischen Potenzials

Die Bestimmung des Cytotoxischen Potenzials einer Verbindung über die durch sie verursachte Wachstumshemmung ermöglicht zwar eine generelle Bewertung der Toxizität. Aussagen über den zu Grunde liegenden Wirkmechanismus sind jedoch nicht möglich. Von großer Bedeutung für die Umweltüberwachung ist die Eigenschaft vieler Chemikalien, das Erbgut eines Organismus zu verändern. Die Beurteilung des gentoxischen Potenzials chemischer Substanzen ist daher ein wesentlicher Bestandteil für die Einschätzung der von diesen Stoffen ausgehenden Gefahr für Mensch und Umwelt. Zur Untersuchung einer Vielzahl verschiedener Substanzen bzw. Proben eignen sich jedoch nur vollständig automatisierbare Verfahren, die auch im großen Maßstab verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse liefern. Für eine wirkungsbezogene Schadstoffanalytik kommen dabei nur Biotestverfahren in Frage. Die P_{RAD54} getriebene Induktion eines auf der Expression von GFP basierenden Fluoreszenzsignals in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Antwort auf Schädigungen in der DNA stellt ein einfaches System zur Beurteilung der gentoxischen Aktivität von chemischen Verbindungen im niedrigen Konzentrationsbereich zur Verfügung.

4.3.1 Untersuchung verschiedener Monosubstanzen

Die Grundlage des Verfahrens ist die transkriptionelle Aktivierung des GFP-Reportergens unter der Kontrolle des durch DNA-Schädigung induzierbaren *RAD54* Promotors. Trotz der sehr verschiedenen Wirkmechanismen und der unterschiedlichen Zielstrukturen der untersuchten Gentoxine konnte für jede dieser Verbindungen eine deutliche konzentrationsabhängige Induktion des Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Die deutlichste Zunahme bei den Netto-Fluoreszenzen wurde dabei für die Substanzen mit direkter DNA-Interaktion beobachtet (MNNG, 4-NQO und MMS, Abb. 3.9 a-c). So wurde die niedrigste Schwellenwertkonzentration aller untersuchten Substanzen für 4-NQO ermittelt. Die zur Gruppe der Hydroxylamine gehörende Substanz durchläuft zum einen einen Redox-Kreislauf, bei dem Superoxidanionen entstehen, die weiter zu reaktiven Sauerstoffspezies (wie z. B. dem Hydroxylradikal) umgewandelt werden kann, welche ihrerseits DNA Strangbrüche und veränderte Basen hervorrufen. Zum anderen reagiert das metabolische Abbauprodukt von 4-NQO, die Substanz 4-Hydroxyaminoquinolin-1-oxid, nach Acylierung direkt mit dem DNA-Molekül und bildet an den N² und N⁶ Positionen von Guanin und Adenin stabile Quinolin-Purin Addukte aus (Ramotar *et al.*, 1998).

MNNG und MMS gehören zu der Gruppe der alkylierenden Verbindungen. Beide Substanzen methylieren zelluläre Makromoleküle über nucleophile Substitutionsreaktionen (SN). Entsprechend ihres Reaktionsmechanismus werden alkylierende Verbindungen dabei in zwei Gruppen eingeteilt: Die SN1-Gruppe, zu der MNNG gehört und die SN2-Gruppe, zu der MMS zuzurechnen ist (Die SN1-Reaktion ist ein monomolekularer, zweistufiger Mechanismus, die SN2-Reaktion verläuft bimolekular und einstufig). Beide Substanzen erzeugen auf molarer Vergleichsbasis zwar in etwa die gleichen Mengen an Methyl-Addukten, jedoch unterscheiden sich diese qualitativ voneinander, MNNG verursacht überwiegend Methylierungen an der O⁶ Position von Guanin, MMS methyliert vornehmlich die Stickstoffatome von Purinbasen. Trotz der ähnlichen Wirkmechanismen ergaben sich deutliche Unterschiede bei den für beide Substanzen ermittelten Schwellenkonzentrationen, welche für MNNG etwa 70fach (auf molarer Basis etwa 90fach) unterhalb der von MMS lag (vergl. Ergebnisse zur Cytotoxizität). Die Ursache für das höhere gentoxische Potenzial von MNNG liegt vermutlich darin, dass die durch diese Substanz hervorgerufenen modifizierten Basen (O⁶-Methylguanin und O⁴-Methylthymin) veränderte Paarungseigenschaften aufweisen, wodurch direkte Mutationen entstehen können. Dagegen erzeugt MMS vorwiegend die Addukte N⁷-Methylguanin und N³-Methyladenin. N³-Methyladenin ist selbst nicht mutagen, blockiert aber die Replikation und wird daher durch 3-Methyladenin-DNA-Glykosylasen entfernt, wodurch sog. AP-Stellen gebildet werden, die zu AT→TA Transversionen führen können. MMS verursacht also hauptsächlich indirekte Mutationen (Glaab *et al.*, 1999; Grzesiuk, 1998; Knippers, 1997).

Da Hydroxyharnstoff (Abb. 3.9 d) im Gegensatz zu den o. g. Verbindungen die Integrität der DNA hauptsächlich auf indirektem Wege beeinflusst (s. Anhang B), spiegelt die im Vergleich zu MNNG, MMS und 4-NQO deutlich höhere Schwellenwertkonzentration von Hydroxyharnstoff das geringere gentoxische Potenzial dieser Substanz adäquat wider. Aufgrund ihrer vorwiegend gentoxischen Eigenschaften lagen bei den untersuchten Gentoxinen die gentoxischen Schwellenwertkonzentrationen um das fünf- bis zwanzigfache unterhalb der zugehörigen EC_{50} -Werte, wobei die Wachstumshemmung bei den Schwellenwertkonzentrationen zwischen 3,4 % (MNNG) und 11,8 % (4-NQO) lag und somit vernachlässigbar war.

Für die untersuchten Schwermetalle (Abb. 3.9 e-h) konnten, mit Ausnahme von Nickel, ebenfalls Schwellenwertkonzentrationen ermittelt werden (Gentoxizität $Cu^{2+} \sim Cr(VI) > Cd$). Auf Basis der Massenkonzentrationen wurde das höchste gentoxische Potenzial dabei für hexavalentes Chrom und für Kupferionen ermittelt. Hexavalentes Chrom wird innerhalb der Zelle in eine trivalente Form umgewandelt, wobei reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die das DNA-Molekül schädigen können (Casadevall und Kortenkamp, 1995; da Cruz Fresco und Kortenkamp, 1994; Sugiyama *et al.*, 1986), daneben kann es bei der Reduktion von Cr(VI) über eine Cr(III) vermittelte Quervernetzung von Glutathion beziehungsweise verschiedener Aminosäuren und dem Phosphatrückgrat der DNA auch zu einer direkten Interaktion kommen, welche letztlich zur Substitution einzelner Basen führen kann (Zhitkovich *et al.*, 2000; Voitkun *et al.*, 1998).

Das mit dem Hefetest nachgewiesene gentoxische Potenzial von Kupfer bestätigt frühere Studien, die auf gentoxische Eigenschaften dieses Schwermetalls hinwiesen (Cavas *et al.*, 2005; Guecheva *et al.*, 2001; Bolognesi *et al.*, 1999; Codina *et al.*, 1995). Die Gentoxizität von Cu^{2+} beruht auf der Bildung von Hydroxyl-Radikalen über eine durch Cu^+ katalysierte Fenton-Reaktion (Flowers *et al.*, 1997). Die so gebildeten Hydroxyl-Radikale binden an das DNA-Molekül und verursachen Strangbrüche (Sagripanti *et al.*, 1991) und Depurinierungen unter Freisetzung von Adeninen (Chan *et al.*, 1982). Darüber hinaus berichteten Guecheva *et al.* (2001) von einer Inhibierung der DNA-Reparatur durch $CuSO_4$ in mit MMS behandelten Zellen (Planaria).

Obwohl der Ames-Test wie auch die meisten anderen Kurzzeit-Gentoxizitätstests negative Resultate bei Cadmium erzielten (mögliche Ursache s. u.), konnte für dieses Metall mit dem Hefetest eine Schwellenwertkonzentration ermittelt werden. Damit übereinstimmend berichteten Brennan und Schiestl (1996) von durch Cadmium verursachten Punktmutationen (Deletionen) in *S. cerevisiae*. Bei erhöhten Konzentrationen kann Cadmium die Biosynthese von DNA, RNA und von Proteinen hemmen, es induziert darüber hinaus die Peroxidation von Lipiden, die Bildung von DNA-Strangbrüchen, von DNA-Protein Quervernetzungen, eine Disregulation der Genexpression und eine veränderte DNA-Reparatur (Mouron *et al.*, 2004). Cadmium und seine Verbindungen als solche gelten jedoch als nur

schwach mutagen (Beyersmann und Hechtenberg, 1997; Hartwig, 1994). In anderen Studien wurde Cadmium als indirekt gentoxisch beschrieben (Valverde *et al.*, 2001, Misra *et al.*, 1998; Koizumi *et al.*, 1992), was auf die Beeinflussung von DNA-Reparaturmechanismen (Waisberg *et al.*, 2003; Beyersmann und Hechtenberg, 1997; Beyersmann, 1994; Hartwig, 1994) und/oder die Entstehung von ROS über nicht Fenton-Reaktionen zurückgeführt wird (Waisberg *et al.*, 2003; Risso-de Faverney *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2001; Brennan und Schiestl, 1996; Koizumi *et al.*, 1992). Beim Hefetest lag die Wachstumshemmung bei Erreichen der gentoxischen Schwellenwertkonzentration für Cadmium bereits bei 60,2 % und damit über dem Gültigkeitskriterium einer maximal erlaubten Wachstumshemmung von 50 %. Misra *et al.* (1998) berichteten von durch Cadmium hervorgerufenen DNA-Schädigungen in Nagerzelllinien ebenfalls erst bei stark cytotoxischen Konzentrationen. Möglicherweise verschleiert die Cytotoxizität gentoxische Eigenschaften bei Verwendung von Kurzzeit-Gentoxizitätstests wie dem Ames-Test, so dass diese deshalb negative Resultate für Cadmium ausweisen. Durch den Hefetest wird Cadmium auf Basis der Massenkonzentrationen trotz höherer Cytotoxizität (EC_{50} : 0,8 mg/l) als geringer gentoxisch eingestuft als Kupfer (EC_{50} : 2,52 mg/l). Auch Bolognesi *et al.* (1999) bewerteten bei einer Untersuchung an Muscheln das gentoxische Potenzial von Cadmium als geringer als das von Kupfer.

Für Co^{2+} konnte mit dem Hefetest kein gentoxisches Potenzial festgestellt werden. In bakteriellen Testsystemen ließen sich auch keine mutagenen Eigenschaften von Cobalt nachweisen (Hartwig, 2000). In *in vitro* Studien an tierischen und menschlichen Zellen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Cobalt(II)-Verbindungen DNA-Schädigungen, DNA-Protein Quervernetzungen, Genmutationen und Schwesterchromatiden-Austausche hervorrufen können (Lison *et al.*, 2001). Darüber hinaus sind wahrscheinlich drei unterschiedliche Mechanismen für eine indirekte Gentoxizität von Co^{2+} verantwortlich: (i) Die Bildung von ROS bei Anwesenheit von H_2O_2 über Fenton-Reaktionen (Mao *et al.*, 1996), (ii) das Ersetzen von Zinkionen in Zinkfingerproteinen, welche die Transkription verschiedener Gene regulieren (Sarkar, 1995) und (iii) das Verdrängen von essentiellen Magnesiumionen in Proteinen, die für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich sind (Kasten *et al.*, 1997). Dass das gentoxische Potenzial von Co^{2+} mit dem Hefetest *in vivo* nicht nachgewiesen werden konnte, lag möglicherweise an der begrenzten Bioverfügbarkeit von Co^{2+} bei physiologischen Phosphatkonzentrationen (K_{sp} $2,5 \times 10^{-35}$ bei 25 °C; Lison *et al.*, 2001). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Co^{2+} an zelleigene Proteinen bindet, wie dies etwa für Serumproteine (z. B. Albumin) schon nachgewiesen werden konnte (Merriat *et al.*, 1984), was sich auch bei der Cytotoxizität in dem, verglichen mit den anderen Schwermetallen, sehr hohen EC_{50} -Wert von 82,9 mg/l widerspiegelt.

Eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals unter Einwirkung von 3,5-Dichlorphenol (Abb. 3.9 i) konnte erst bei Konzentrationen festgestellt werden, die eine Wachstumshemmung von deutlich über 50 % verursachten. Damit weist der Hefetest diese Substanz als wenig gentoxisch aus. In der Literatur finden sich keine Angaben zu möglichen gentoxischen Eigenschaften.

Das nachgewiesene gentoxische Potenzial von herkömmlichem Kochsalz (Abb. 3.9 n), das mit einem Schwellenwert von 5000 mg/l unter der Salzkonzentration von Meerwasser lag (35000 mg/l) bestätigt publizierte Daten zum gentoxischen Potenzial von Natriumchlorid. Kültz und Chakravarty (2001) sowie Galloway *et al.* (1987) konnten in Säugerzellen durch NaCl induzierten hyperosmotischen Stress (17550 mg/l) verursachte Doppelstrangbrüche nachweisen. Parker und Borstel (1990) wiesen ein gentoxisches Potenzial von Kochsalzlösung (29250-117000 mg/l) auch in logarithmisch wachsenden Hefezellen nach. Wie Natriumchlorid Doppelstrangbrüche verursacht, ist gegenwärtig noch nicht abschließend geklärt. Dmitrieva *et al.* (2004) postulierten, dass eine Erhöhung der Salzkonzentration die Reparatur natürlich auftretender DNA-Strangbrüche verhindert, wodurch es zu einer Akkumulation von Bruchstellen kommt. Kültz und Cakravarty (2001) zogen weitere Mechanismen in Betracht: (i) die erhöhte mechanische Beanspruchung des DNA Moleküls u. a. als Folge der erhöhten Ionenstärke, (ii) die Bildung freier Radikale und/oder (iii) das Verdrängen von Histonen und anderer positiv geladener Kernproteine von der negativ geladenen DNA durch positiv geladene Ionen, wodurch die Anfälligkeit des DNA Moleküls gegenüber mechanischer Beanspruchung erhöht wird. Zhang *et al.* (2004) zeigten, dass zumindest ein Teil der durch Natriumchlorid (17550 mg/l) verursachten DNA-Schäden durch oxidativen Stress ausgelöst wird.

Acetaminophen (Paracetamol, Abb. 3.9 l) verursacht weder in Bakterien noch in Säugerzellen *direkte* Genmutationen, (Bergmann *et al.*, 1996). Ein reaktives Abbauprodukt dieses Schmerzmittels, N-Acetyl-p-Benzoquinon (NAPQI), kann jedoch DNA Einzelstrangbrüche hervorrufen (Dybing *et al.*, 1984), allerdings erst bei stark cytotoxischen Konzentrationen (400 mg/l). Trotzdem finden sich in der Literatur Hinweise auf durch hohe Dosen verursachte Chromosomenschädigungen (reviewed in Bergman *et al.*, 1996). Drei mögliche Mechanismen zur Gentoxizität von Paracetamol sind möglich: (i) Inhibition der Ribonucleotid-Reduktase, (ii) Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels im Cytosol und im Kern und (iii) durch NAPQI verursachte DNA-Schädigung bei Erschöpfung des Glutathion-Vorrates (Bergman *et al.*, 1996; Brunborg *et al.*, 1995). Der mit dem Hefetest für dieses Analgetikum ermittelte gentoxische Schwellenwert (300 mg/l) lag deutlich über der therapeutischen Dosis (> 10 mg/l Plasmaspiegel) und um mehr als das Doppelte über der durchschnittlichen Plasmakonzentration, die bei Suiziden und Suizidversuchen mit dieser Substanz ermittelt

werden kann (~122 mg/l). Auch Bergman *et al.* (1996) schlossen gentoxische Effekte von Paracetamol bei therapeutischen Dosen aus.

Zur Gentoxizität von Diclofenac (Abb. 3.9 k) finden sich in der Literatur nur wenige Hinweise. Während Kullich und Klein (1986) mit einer Methode zur Bestimmung der Schwesterchromatiden-Austauschrate keinerlei genetische Effekte von Diclofenac feststellen konnten, berichteten Kuboyama und Fujii (1992) von zumindest tendenziell DNA schädigenden Eigenschaften dieses Analgetikums im bakteriellen *in vitro* Rekombinations-Reparatur Prüfverfahren („rec-assay“, Kada *et al.*, 1972). Mit Hilfe des Hefetestes ließ sich für diese Substanz mit 75,0 mg/l ein gentoxischer Schwellenwert ermitteln, der etwa 1000fach über der maximalen Plasmakonzentration nach oraler Einnahme der Substanz liegt (4-80 µg/l). Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine Gentoxizität von Diclofenac bei therapeutischen Dosen auszuschließen ist.

Auch für das Insektizid Lindan (Abb. 3.9 j) gibt es wenige Daten zur Gentoxizität. Bhunya und Jena (1992) stuften diese Substanz aufgrund verschiedener *in vivo* Studien an Hühnern als gentoxisch ein. Pool-Zobel *et al.* (1993) konnten mit verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Verfahren ein gentoxisches Potenzial von Lindan erst bei stark cytotoxischen Konzentrationen (145 mg/l) beobachten. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind zurzeit noch völlig ungeklärt. Die mit dem Hefetest ermittelte gentoxische Schwellenkonzentration liegt mit 2,2 mg/l in einem Bereich jenseits ökologischer und pharmakologischer Relevanz. Bei Koffein (Abb. 3.9 m) handelt es sich um die wohl am intensivsten untersuchte, natürlich vorkommende Substanz. Große Aufmerksamkeit wurde dabei den potenziellen gentoxischen Eigenschaften dieser Substanz gewidmet. In verschiedenen Studien wurden gentoxische Effekte unter Einwirkung von Koffein erst bei extrem hohen Dosierungen von > 1 mM (entspricht 194,2 mg/l) nachgewiesen (reviewed in D'Ambrosio, 1994). Der mit der Hefe ermittelte gentoxische Schwellenwert von 187,5 mg/l liegt auf einem damit übereinstimmenden Niveau. Die gentoxische Eigenschaft dieser Substanz beruht auf einer Inhibition der DNA Synthese (Kaufmann *et al.*, 2003). Bei Serum-Spiegeln, die selbst bei exzessivem Konsum im mikromolaren (µM) Bereich liegen, ist Koffein jedoch als nicht gentoxisch für den Menschen einzustufen.

4.3.2 Vergleich verschiedener Expositionszeiten

Obwohl es bei Erhöhung der Versuchsdauer von 8 h auf 24 h zu einer deutlich verminderten Wachstumshemmung kam, konnte ein derartiger Einfluss auf das gemessene Fluoreszenzsignal nicht festgestellt werden (Abb. 3.10). Die Ursache für den geringen Einfluss der Versuchsdauer auf die relativen Unterschiede zwischen Probe und Negativkontrolle liegt in der, von Cubitt *et al.* (1995) beschriebenen, hohen Widerstandsfähigkeit des vollständig gefalteten GFP gegenüber Proteasen und der damit verbundenen hohen Stabilität dieses Proteins. GFP-spezifische Fluoreszenz ist auch in stationären Kulturen noch nach mehreren Wochen feststellbar. Das zum Versuche gemessene GFP-Signal einer Kultur stellt daher die über den gesamten Zeitverlauf akkumulierte Entwicklung der GFP-Expression in dieser Kultur dar und nicht punktuell das gegenwärtige Expressionsniveau zum Messzeitpunkt. Dabei ist aber zu beachten, dass das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zueinander (n-te Probe zu Negativkontrolle) von einer Erhöhung der Expositionsdauer zwar kaum betroffen ist, sich jedoch die absoluten Fluoreszenzintensitäten bezogen auf die einzelne Zelle verringern. Das Verhältnis aus absoluter (der gemessenen) Fluoreszenz und der Zellzahl sinkt für die Negativkontrollen von durchschnittlich etwa 8000 AU nach 8 h auf etwa 5000-6000 AU nach 24 h.

4.3.3 Metabolische Aktivierung durch Leberhomogenisat (S9-Aktivierung)

In prokaryotischen Testverfahren wie dem Ames Test (Ames *et al.*, 1973) oder dem *umu*-Test (Oda *et al.*, 1985) wird das Fehlen von multifunktionellen Monooxygenasen durch Verwendung von S9-Rattenleberhomogenisat im Reaktionsansatz kompensiert. Obwohl dieses System bei bakteriellen Verfahren gut geeignet und etabliert ist, war eine entsprechende metabolische Aktivierung im Hefetest nicht geeignet. So ergaben sich bei der Kontrolluntersuchung der direkt gentoxisch wirkenden Substanz MNNG (metabolische Aktivierung nicht notwendig) unter Verwendung des Rattenleberhomogenisates wie erwartet nur sehr geringfügige Unterschiede zu den Untersuchungen ohne metabolische Aktivierung (Abb. 3.11 a). Aber auch bei der Untersuchung des Progentoxins 2-Aminoanthracen (metabolische Aktivierung notwendig) führte die Verwendung des Rattenleberhomogenisates zu keiner signifikanten Erhöhung der nachgewiesenen gentoxischen Aktivität (Abb. 3.11 b).

Die Resultate stimmen mit den Angaben verschiedener Publikationen überein, in denen die Verwendung von (Nager-)Leberhomogenisat zur Erhöhung der gentoxischen Aktivität von Progentoxinen bei hefebasierten Nachweisverfahren als prinzipiell ungeeignet beschrieben wurde (Bianchi *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 1988; Kelly und Parry, 1983; Migliore *et*

al., 1982). White *et al.* (1996) berichteten von einem Rückgang des gentoxischen Potenzials durch S9-Aktivierung in über 90 % der in der Studie untersuchten Umweltproben.

Fabiani *et al.* (2005) postulierten, dass hochmolekulare Bestandteile der S9-Fraktion genau wie die Proteinbestandteile von fetalem Rinderserum (siehe auch Abschnitt 4.5.2) die toxische Aktivität einiger Substanzen (z. B. durch Bindung) unabhängig von einer möglichen metabolischen Aktivierung beeinflussen können, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse (+S9 vs. –S9) deutlich herabsetzt.

Die rote Eigenfärbung des Leberhomogenisates bewirkte eine erhebliche Beeinträchtigung der Trübungsmessung, die jedoch durch Verwendung entsprechender Leerwertkontrollansätze berücksichtigt wurde. Die Zugabe der S9-Fraktion führte darüber hinaus zu stark erhöhten Hintergrundfluoreszenzen, die über den Werten des P_{RAD54} vermittelten, GFP spezifischen Fluoreszenzsignals lagen. Die Darstellung von Netto-Fluoreszenzen wird dadurch deutlich erschwert. Ein direkter Einfluss von S9 Rattenleberhomogenisat auf die Messung von Fluoreszenzsignalen wurde von Dreier *et al.* (2002) beschrieben. Neben der hohen Eigenfluoreszenz der S9-Fraktion verfügt diese über die Eigenschaft, verschiedene Fluophore binden zu können, und so die Fluophor spezifische Fluoreszenz herabzusetzen (Dreier *et al.*, 2002). Dies könnte zu einer Maskierung einer GFP spezifischen Fluoreszenzzunahme in der Hefe führen.

Die konzentrationsabhängige Zunahme des Fluoreszenzsignals durch 2-Aminoanthracen auch ohne zusätzliche metabolische Aktivierung lässt überdies die Schlussfolgerung zu, dass die hefeeigenen Cytochrom P450 Oidasen Erg5p und Erg11p eine S9-Aktivierung möglicherweise partiell ersetzen können.

4.3.4 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Daten belegen, dass die Aktivität des *RAD54* Promotors in *S. cerevisiae* in Verbindung mit dem *GFP* Reportergen geeignet ist, das gentoxische Potenzial von Monosubstanzen qualitativ und quantitativ reproduzierbar nachzuweisen. Die Art der Auswertung ermöglicht die Bestimmung der kleinsten, noch gentoxischen Substanzkonzentration im Test (*LOEC*). Das Verfahren unterscheidet dabei zuverlässig zwischen stark gentoxischen Substanzen (z. B. 4-NQO) und weniger bis nicht gentoxischen Einzelstoffen (z. B. 3,5-DCP). Der Einfluss der Inkubationszeit auf die Detektion des Fluoreszenzsignals als relevantem Parameter ist zu vernachlässigen. Die Zugabe von S9-Leberhomogenisat zum Testansatz ist aufgrund starker Fluoreszenzeigenschaften für die metabolische Aktivierung von Progentoxinen in Hefe ungeeignet.

4.4 Die Untersuchung von Abwasserproben

Das Hefe-Testsystem eignet sich für den Nachweis toxischer Eigenschaften von wasserlöslichen Substanzen. Es stellte sich die Frage, inwieweit dieses System auch für das Monitoring von Umweltproben herangezogen werden kann, weil hier höhere Anforderungen bezüglich Störanfälligkeit, Reproduzierbarkeit und Sensitivität erfüllt werden müssen, da die Ergebnisse u. U. gerichtsfest sein müssen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden gereinigte Abwässer eines Raffineriebetriebes (einfach verblindet) untersucht.

4.4.1 Mögliche Störungsquellen und Fragen zur Plausibilität

Bei Abwasserproben handelt es sich im Gegensatz zu Monosubstanzen nicht um steriles Probengut. Fremdbürtige Keime können jedoch bei Wachstumsmessungen zu falsch negativen Ergebnissen führen, da das verwendete Nährmedium sich nicht nur für das Wachstum der Hefe eignet, sondern auch für das Wachstum probenbürtiger Keime, was eine vom Wachstum des Testorganismus unabhängige Trübungszunahme verursachen kann. Ein Wachstum probenbürtiger Keime war in den Leerwertkontrollansätzen jedoch nicht nachweisbar. Die Teilungsaktivität der Fremdorganismen war demnach vernachlässigbar gering. Dies kann möglicherweise auf die Zusammensetzung des Nährmediums zurückgeführt werden, das besonders auf die Bedürfnisse der Hefezelle ausgerichtet war.

Weitere mögliche Störquellen bei den Messungen liegen in einer Eigenfärbung und/oder Eigentrübung der Probe. Derartige Einflüsse werden ebenfalls mit Leerwertkontrollansätzen überwacht (bereits zu Versuchsbeginn im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte Trübungsbzw. Fluoreszenzwerte bei steigendem Probenanteil). Für die untersuchten Proben konnten solche Effekte jedoch nicht beobachtet werden.

Die Untersuchung von Abwasser bedingt die Verwendung eines konzentrierten Nährmediums, um in den Testgefäßen einen hohen Probenanteil zu ermöglichen, ohne dass es zu einer Veränderung der finalen Konzentration der Nährstoffbestandteile kommt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Medienbestandteile in der komplexen Matrix Abwasser anders verhalten als bei Aufnahme in hochreinem Wasser. So können zum Beispiel die in der Probe gelösten Stoffe die Bioverfügbarkeit der Medienbestandteile beeinflussen, was zu einem veränderten Wachstums- und Fluoreszenzverhalten der Hefezellen führen würde. Bei den untersuchten Proben konnte eine derartige Beeinflussung jedoch nicht festgestellt werden. Käme es zu einer Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von Bestandteilen des Nährmediums durch die Matrix Abwasser, würde allein die Erhöhung des Probenanteils im Testansatz ein verändertes Wachstum bedingen (unabhängig von einem möglichen

Schadstoffgehalt). Bei der Untersuchung der beiden Referenzproben *Leitungswasser* und *Rheinwasser* konnte davon ausgegangen werden, dass die potenzielle Schadstoffmenge deutlich unterhalb der Nachweisgrenze des Hefe-Tests lag. Eine Beeinflussung der Parameter Wachstum und/oder Fluoreszenzentwicklung aufgrund von Schadstoffen war daher auszuschließen. Da es zu keiner Beeinflussung der Testparameter durch steigende Anteile der beiden Referenzproben kam, ist davon auszugehen, dass das Verfahren zuverlässig zwischen belasteter und unbelasteter Abwasserprobe unterscheiden kann. Demnach wurde die positive Reaktion des Systems auf die Proben 1 bis 6 allein durch deren Schadstoffinventar verursacht.

4.4.2 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Ein Nachweisverfahren zur Ermittlung toxischer Eigenschaften muss neben der gewünschten Sensitivität auch über eine hohe Reproduzierbarkeit (geringe Streuung) der Testergebnisse verfügen. Bezüglich der Beurteilung der Reproduzierbarkeit des Verfahrens wurden zur Orientierung die Vorgaben der USEPA (1971) herangezogen. Diese sehen für die Streuung der Testergebnisse eine Genauigkeitsgrenze von 15 % vor.

Die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert aus jeweils drei Einzelversuchen bezogen auf den Parameter Wachstumshemmung lag trotz der geringen Zahl an Wiederholungen ($n=3$) bei durchschnittlich 10,7 %. Die prozentuale Abweichung lag dabei zwischen 3,3 % für die zentrifugierte Probe 6 und (aufgrund eines Ausreißers) 18,8 % für die unbehandelte Probe 1. Innerhalb einer Versuchsreihe aus drei Versuchen wichen die resultierenden G-Werte um maximal eine Verdünnungsstufe voneinander ab, außer bei der zentrifugierten Probe 1, diese zeigte mit zwei Verdünnungsstufen eine größere Abweichung. Die prozentuale Abweichung vom Mittelwert lag bei den Induktionsraten bei durchschnittlich 4,0 %. Die Streuung bewegte sich in den Grenzen von 0,5 % bei der Untersuchung des unbehandelten Rheinwassers bis hin zu 10,8 % für die zentrifugierte Probe 4. Obwohl die Streuung bei der Induktionsrate sehr niedrig lag, war die Abweichung bei den G-Werten innerhalb einer Serie aus drei Versuchstagen höher als die bei der Wachstumshemmung. Hier wurden Abweichungen von bis zu drei Verdünnungsstufen zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Wert festgestellt. Dies ist dadurch zu erklären, dass in dem verwendeten Verfahren kein fixer gentoxischer Schwellenwert wie etwa $IR > 1,5$ beim *umu*-Test (DIN 38415-3 [1996]) verwendet wird, sondern der Schwellenwert über statistisch relevante Abweichungen der mittleren gemessenen Fluoreszenz in den Testansätzen von der durchschnittlichen Fluoreszenz der zugehörigen Negativkontrollansätze ermittelt wird. Damit kann die für die gleiche Verdünnungsstufe an zwei Versuchstagen gemessene, sehr ähnliche Induktionsrate an einem der Tage auf-

grund einer geringen Streuung innerhalb der sechs Kavitäten dieser Verdünnungsstufe einen signifikanten Unterschied zum Negativkontrollansatz aufweisen, an dem anderen Tag wegen einer höheren Streuung jedoch nicht (t-Test, Signifikanzniveau 95 %). Insgesamt wird dieses Verfahren aufgrund der höheren Aussagekraft im Vergleich zu fixen Grenzwerten als vorteilhaft bewertet, da dort die Streuung der zu Grunde liegenden Einzelwerte nicht berücksichtigt wird.

Darüber hinaus sind Toxizitätsunterschiede zwischen hohen G-Werten (aufgrund zunehmend kleiner werdenden Unterschieden beim absoluten Abwasseranteil) deutlich geringer als zwischen niedrigen G-Werten. Daher führen im hohen G-Wert Bereich bereits kleine Messunterschiede zu einer abweichenden Verdünnungsstufe.

Mit Ausnahme der Probe 1 bewegte sich die Streuung bei allen untersuchten Proben zum Teil deutlich unterhalb der Grenze von 15 %, was die gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens belegt.

4.4.3 Der Einfluss von Schwebstoffen auf die Toxizität der Abwasserproben

Einer der Charakteristika von nativen Proben ist das Vorhandensein von Schwebstoffen. Ein weiteres Charakteristikum ist das unterschiedliche Verhalten von verschiedenen Schadstoffgruppen. Einige Schadstoffe sind wasserlöslich, direkt biologisch verfügbar und unmittelbar toxisch wirksam (Björk, 1995; Currie *et al.*, 1998). Andere Schadstoffe kommen ausschließlich schwebstoffgebunden vor, sind im Wasserkörper nicht biologisch verfügbar und nur mittelbar toxisch wirksam (Bruner *et al.*, 1994; Hermesen *et al.*, 1994; Gagnon und Fisher, 1997; Kaag *et al.*, 1998). Borchering und Jantz (1997) haben in Untersuchungen zur Toxizität von Rheinwasserproben gezeigt, dass die Bioverfügbarkeit von Pentachlorophenol (PCP) bei erhöhter Trübung der Probe durch adsorptive Prozesse deutlich abnahm. Für den Bereich der Ökotoxikologie sind an Schwebstoffe gebundene Gifte von großer Bedeutung (Hermesen *et al.*, 1994; Davies und Simkiss, 1996).

Die Ergebnisse zur Abwasseruntersuchung ließen keinen signifikanten Unterschied zwischen der schwebstoffhaltigen (unbehandelten) und der schwebstofffreien (zentrifugierten) Probe erkennen (t-Test mit zweiseitiger Fragestellung, Signifikanzniveau 95 %). Das Entfernen der Schwebstoffe hätte bei partikelassoziierten Giftstoffen zu einer relativ verminderten Toxizität der Proben geführt. Daher kann der Schluss gezogen werden, dass die toxische Wirkung auf wasserlösliche Stoffe zurückzuführen ist.

4.4.4 Probenalter und Toxizität

Die in Tabelle 3.4 zusammengefassten Daten zur Cytotoxizität der Abwasserproben zeigten die insgesamt geringere Toxizität der Proben 4, 5 und 6. Dabei handelte es sich bei den Probenpaaren 1/5, 2/4 und 3/6 jeweils um anonymisierte Aliquote derselben Probe, wobei der Unterschied in der um etwa vier Wochen späteren Analyse lag. Ein solcher Rückgang des toxischen Potenzials einer tiefgefroren gelagerten Probe kann, wie in einigen Studien beschrieben, auf eine Evaporation organischer Verbindungen oder auf den Prozess des Einfrierens selbst zurückzuführen sein (Naudin *et al.*, 1995). Von einer nachlassenden Toxizität von Sedimenten durch vierzehntägiges Einfrieren berichten Schuytema *et al.* (1989). Die Autoren vermuteten ursächlich die Freisetzung von löslichen, organischen Kohlenstoffverbindungen während der Lagerung. Die mit dem Hefetest ermittelte geringere Toxizität der jeweils später untersuchten Teilmengen identischer Proben bestätigt die zitierten Beobachtungen. Gegen eine Störanfälligkeit des Verfahrens als ursächliche Erklärung für die geringeren Toxizitätswerte (G-Werte) können die folgenden Argumente angeführt werden: i) Bei allen Probenpaaren lag die Toxizität der jeweils später untersuchten Teilmenge unterhalb der Toxizität der zuerst getesteten Teilmenge, nie jedoch umgekehrt. Bei einem störanfälligen Verfahren hätte auch der entgegengesetzte Fall auftreten können, wobei jedoch die geringe Probenzahl zu beachten ist. ii) Die geringe Schwankungsbreite der einzelnen Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchsdurchführungen für jede einzelne Probe lässt auf eine gute Reproduzierbarkeit schließen. Bei einem weniger robusten System wäre eine höhere Streuung auch innerhalb einer Versuchsreihe aus drei Einzelversuchen zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse zeigen vielmehr die hohe Empfindlichkeit des Testsystems, da die aufgrund der Lagerungszeit nachlassende Toxizität der organisch belasteten Proben nachgewiesen werden konnte.

4.4.5 Schlussfolgerungen

Die Proben des Raffineriebetriebes wurden als gen- und cytotoxisch bewertet. Der Schwebstoffgehalt hatte keinen Einfluss auf die nachgewiesene Toxizität. Demnach müssen die vorhandenen Schadstoffe wasserlöslich gewesen sein. Einen deutlichen Einfluss auf die Toxizität hatte jedoch die Lagerung der Proben. Vor dem Hintergrund, dass es sich bei den Proben um Abwasser aus der Verarbeitung von Erdöl und von Erdölprodukten handelt, kann sicher angenommen werden, dass sich der Schadstoffgehalt hauptsächlich aus organischen Kohlenwasserstoffverbindungen zusammensetzt. Viele dieser Verbindungen sind leichter flüchtig und erklären die geringere Toxizität nach einer längeren Lagerungszeit der Proben.

4.5 Die Aktivität des PMA1-Promotors als Maß für die metabolische Aktivität

Das strukturelle Zellmembranprotein Pma1 ist ein wesentliches Element für die Überlebensfähigkeit und die Aufrechterhaltung grundlegender Stoffwechselvorgänge wie zum Beispiel die Erzeugung des Membranpotenzials in Hefe. Ihr Anteil an der Gesamtproteinmenge in der Membran liegt bei etwa 15-20 % (Ambesi *et al.*, 2000). Die Expression von *PMA1* unterliegt wie die vieler anderer Gene auch dem Einfluss äußerer Bedingungen. So wird in der Hefe unter dem Einfluss exogener Stressfaktoren (z. B. Hitzeschock und toxische Verbindungen) eine so genannte *environmental stress response* (ESR) hervorgerufen (Gasch *et al.*, 2001), welche mehr als 900 verschiedene Gene (etwa 14 % des Genoms) umfasst, deren Expression bei Stress verändert wird. Unter den dabei *reprimierten* Genen sind viele an der Proteinbiosynthese und am Metabolismus beteiligt, und man geht davon aus, dass die Repression dieser Gene unter Stressbedingungen dazu dient, Energie in der Zelle einzusparen (Gasch *et al.*, 2001). Für das Gen der H^+ -ATPase Pma1p, welche für 24-40 % des zellulären ATP Verbrauchs verantwortlich ist, konnte eine Repression unter Einfluss steigender Konzentrationen toxischer Substanzen bereits nachgewiesen werden (Rao und Slayman, 1996; Gradmann *et al.*, 1978). Wie ein großer Teil der im ESR Programm *reprimierten* Gene, unterliegt auch P_{PMA1} (mit drei Bindestellen) der Regulation durch den transkriptionellen Aktivator Hap1p. Durch toxische Verbindungen hervorgerufener Stress reduziert direkt oder indirekt die Aktivität von Hap1p und damit die Aktivität der von Hap1p regulierten Gene (Gasch *et al.*, 2001; Fernandes und Sá-Correia, 2003).

Um dynamische Veränderungen der P_{PMA1} vermittelten Transkription nachzuweisen, wurde eine destabilisierte Version des Reportergens yEGFP durch Anfügung des Carboxyl-Terminus des G_1 Cyclins aus Hefe (Cln2p) hergestellt. Der Vergleich der Emissionsmaxima in Abb. 3.14 zeigte eine um etwa 70 % herabgesetzte Fluoreszenzintensität des destabilisierten Chromophors im Vergleich zu der des nicht modifizierten Proteins. Da die P_{PMA1} getriebene Transkriptionsrate nicht durch Substanz-Exposition beeinträchtigt war und für beide Konstrukte gleich gewesen sein sollte, wurde die beobachtete Verringerung der Fluoreszenzintensität für GFP-PEST auf einen erhöhten Proteinabbau und ein, damit verbunden, reduziertes Fließgleichgewicht zwischen Synthese und Degradation zurückgeführt. Die beobachtete Reduktion war jedoch geringer als die um den Faktor 16 herabgesetzte Fluoreszenzintensität von GFP-PEST gegenüber GFP bei chromosomaler Expression einer einzelnen Kopie in exponentiell wachsenden Zellen, wie von Mateus und Avery (2000) beschrieben. Die in Abb. 3.14 dargestellten Emissionsspektren entsprachen den Fluoreszenzprofilen bei episomaler Expression von Mehrfachkopieplasmiden in stationären Zellen unter Verwendung des star-

ken, konstitutiven *PMA1* Promotors. Eine Überlagerung der spezifischen Fluoreszenz durch Akkumulation oxidierter Flavine in der stationären Phase wurde nicht festgestellt.

4.5.1 Testung von Monosubstanzen

Die niedrigsten *EC*-Werte wurden bei diesem Verfahren für MNNG (Abb. 3.16 c) ermittelt. Für methylierende Verbindungen wie MNNG wurde ein Einfluss auf die *ESR* bereits dokumentiert (Gasch *et al.*, 2001). Hydroxyurea (HU, Abb. 3.16 d) als zweite untersuchte gentoxische Verbindung verursacht einen Zellzyklusarrest sowohl in der G2 als auch in der S Phase über Mechanismen, bei denen keine direkte Interaktion mit dem DNA-Molekül vorliegt (Khayat *et al.*, 2004). Diese nur indirekte Interaktion spiegelt sich in der im Vergleich zu MNNG deutlich schwächeren Hemmung der Fluoreszenzentwicklung wider. Nach MNNG wiesen die untersuchten Schwermetalle (Abb. 3.16 g-j), mit Ausnahme von Cobalt (Co^{2+}), die höchste Toxizität auf. Die Wirkmechanismen, die der Toxizität der Schwermetalle zugrunde liegen, sind vielfältig, wobei ein großer Teil ihres toxischen Potenzials mit dem durch sie verursachten oxidativen Stress (ROS) in Verbindung gebracht wird. Dabei wird die zelluläre Konzentration an ROS entweder direkt erhöht oder deren Akkumulation durch Schwächung der antioxidativen Kapazität indirekt gefördert. Unter den Schwermetallen sind viele der so genannten Übergangsmetalle wie z. B. Kupfer an Redoxreaktionen bei Atmungsvorgängen beteiligt, andere wie z. B. Cobalt sind Teil komplexer Moleküle und stabilisieren Proteine wie auch DNA Strukturen. Cadmium, Blei, Quecksilber und hexavalentes Chrom haben keinerlei solcher Funktionen und sind bereits in kleinen Dosen toxisch. Entsprechend wurden für Cd^{2+} und für Cr(VI) mit *EC*₂₀-Werten von 2,0 mg/l beziehungsweise 2,5 mg/l ähnliche Toxizitäten ermittelt. Die intrazelluläre Reduktion von Cr(VI) ist für die Entstehung von ROS verantwortlich (Sudgen und Stearns, 2000; Liu und Shi, 2001), was über eine Absenkung der Hap1p Aktivität zu einer verminderten Expression des *PMA1* Gens geführt haben könnte.

Der ermittelte *EC*₂₀-Wert für Kupfer (Cu^{2+}) lag mit 2,9 mg/l etwas über denen für Chrom und Cadmium. Die beobachtete Hemmung der *P*_{PMA1} getriebenen GFP Expression bei steigenden Kupferkonzentrationen bestätigt die in früheren Untersuchungen mit Hefezellen beobachtete dosisabhängige (0 bis 95,25 mg/l) Hemmung der *PMA1* Expression in Gegenwart von Kupfer (Fernandes *et al.*, 1998). Die Hemmung der Expression ist vermutlich auf eine zunehmende Beeinträchtigung von Hap1p durch verstärkte Bildung von ROS und/oder durch unkontrollierte Komplexbildung mit Kupferionen zurückzuführen.

Co^{2+} Ionen zeigten keinerlei toxische Effekte innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches.

Chlorinierte Phenole wie 3,5-Dichlorphenol (Abb. 3.16 f) werden in der chemischen Industrie vielfach als Vorprodukte von Chemikalien für den Agrarbereich aber auch für andere Produkte eingesetzt und kommen häufig als Holzschutzmittel, Fungizide, Bakterizide und als Algizide zum Einsatz. Aufgrund seiner ökologischen Relevanz (wird als giftig für wasserlebende Organismen mit möglicherweise langfristig negativen Effekten eingestuft) und wegen seiner toxikologischen Eigenschaften (liefert bei den meisten Wachstumshemmtests positive Ergebnisse) wird 3,5-DCP häufig als Referenzsubstanz verwendet. Der ermittelte EC_{20} -Wert von 6,27 mg/l weist 3,5-DCP als lediglich moderat toxisch aus, was auf die spezifische Wirkungsweise der Substanz zurückzuführen ist (s. 4.2.1). Bei höheren Konzentrationen verursachte die Substanz jedoch die stärkste absolute Hemmung des Fluoreszenzsignals (auf 10 % des Wertes der zugehörigen Negativkontrollansätze) aller untersuchten Substanzen.

Aufgrund der im Anhang B ausführlich beschriebenen spezifischen Wirkungsweise von Lindan (Abb. 3.16 e) war die nachgewiesene Toxizität in Hefe nur sehr gering. Die ermittelten EC -Werte lagen jenseits biomedizinischer bzw. ökologischer Relevanz. Entsprechend wurde aufgrund primär neuroaktiver Eigenschaften auch für Koffein eine nur geringe Toxizität nachgewiesen. Der ermittelte EC_{20} -Wert lag bis zu 20fach über der Blutkonzentration, die beim Menschen Rastlosigkeit, Nervosität, Zittern, Kopfschmerz, Ohrensausen (Tinnitus) und Schlaflosigkeit verursacht (10-30 mg/l).

Hohe Konzentrationen Natrium sind toxisch für Zellen, da viele Stoffwechselwege und Membranfunktionen durch osmotischen Stress beeinflusst werden. Steigende Salzkonzentrationen verursachten eine deutliche Hemmung des Fluoreszenzsignals (Abb. 3.16 k), wahrscheinlich verursacht durch eine verringerte Hap1p Aktivität (möglicherweise über eine Beeinflussung der Tertiärstruktur).

4.5.2 Der Einfluss von FBS auf die Repression des Fluoreszenzsignals

Von vielen Verbindungen mit z. T. sehr unterschiedlichen chemischen Eigenschaften ist seit langem bekannt, dass sie reversibel an Serumproteine binden können. Das Binden dieser Chemikalien an Serumproteine beeinflusst ihre pharmakologische Aktivität *in vivo*, da lediglich der nicht gebundene Anteil einer Verbindung in einem Medium wie Blut in der Lage ist, in die Zielgewebe zu gelangen (Ishihama *et al.*, 2002; Tanaka und Mizojiri, 1999).

Die Gegenwart von 20 % fötalem Rinderserum im Nährmedium verursachte bei den untersuchten Substanzen eine Verschiebung der jeweiligen Konzentrations-Wirkungs-Kurven, wobei dieser Effekt für die verschiedenen Substanzen unterschiedlich ausfiel. Der deutlichste Einfluss von Serumproteinen auf das toxische Potenzial wurde dabei bei Kupferionen (Cu^{2+} , Abb. 3.17 c) festgestellt. Während Kupfer in Serum freiem Nährmedium eine signifikante

Repression des Fluoreszenzsignals verursachte (EC_{20} -Wert: 2,9 mg/l, Abb. 3.16 j), konnte in Gegenwart von FBS keine Fluoreszenzabnahme mehr festgestellt werden. Die Zugabe von FBS führte zu einem vollständigen Verlust des toxischen Potenzials von Cu^{2+} innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches (die Berechnung von EC -Werten war daher nicht mehr möglich). Der Einfluss von Serumproteinen auf die Bioverfügbarkeit von Schwermetallen aufgrund einer Bindung der Metallionen an die freien Thiol-Gruppen von Proteinen wie z. B. Ceruloplasmin, Albumin und Transcuprein ist in der Literatur dokumentiert (Luza und Speisky, 1996; Corrigan und Huang, 1981; Fang und Fallin, 1976). Die Reduktion der Toxizität von Kupfer nach Exposition in serumhaltigem Nährmedium wird daher auf die schützende Wirkung von Serumproteinen gegenüber Schwermetallionen zurückgeführt.

Der Einfluss von FBS auf das toxische Potenzial von Diclofenac (Abb. 3.17 b) fiel mit einem um den Faktor 2,2 erhöhten EC_{20} -Wert (Halbierung des toxischen Potenzials) geringer aus. Von dieser pharmazeutischen Substanz ist bekannt, dass sie proteingebunden vorliegt (etwa 99,5 % innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 2-10 mg/l), wobei der Grad der Proteinbindung mit steigender Konzentration abnimmt (Chan *et al.*, 1987; Chamouard *et al.*, 1992). Die Proteinbindung beruht auf nicht kovalenten Wechselwirkungen zwischen Diclofenac und dem Serumprotein Albumin (van Boekel *et al.*, 1992). Dieser hohe Grad der Proteinbindung ist wahrscheinlich für die reduzierte Toxizität von Diclofenac im serumhaltigen Nährmedium verantwortlich.

Obwohl Koffein über einen weiten Konzentrationsbereich zu 10-35 % an Serumproteine, dabei vor allem an Albumin, bindet (Blanchard, 1982), wurde mit dem Hefetest eine erhöhte Toxizität dieser Substanz in serumhaltigem Nährmedium festgestellt (Abb. 3.17 a). Da an Proteine gebundene Substanzen von diesen dissoziieren und anschließend biologische Membranen passieren können, kann die von einer Substanz tatsächlich verursachte Wirkung höher ausfallen als das der freie, ungebundene Anteil vermuten lässt. Dieses Argument reicht jedoch nicht aus, den beobachteten Anstieg der Toxizität von Koffein in Gegenwart von FBS zu erklären. Für Natriumchlorid wurde mit Hilfe des Hefetestes eine (leicht) erhöhte Toxizität bei Anwesenheit von FBS mit einem um den Faktor 1,3 niedrigeren EC_{20} -Wert festgestellt (Abb. 3.17 d). Kirtane *et al.* (1994) beschrieben dazu passend einen um den Faktor 1,5 erhöhten Eintritt von Na^+ (verbunden mit einer Erhöhung der zellulären Na^+ Konzentration) nachdem Rattenleberzellen 10 % Kälberserum ausgesetzt wurden.

4.5.3 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität des *PMA1* Promotors in *S. cerevisiae* in Verbindung mit einer destabilisierten Version des GFP geeignet ist, substanzvermittelten Stress in lebenden Zellen als Haushaltsbiomarker nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Hemmung der Fluoreszenzzunahme als Nachweisparameter ermöglicht die Berechnung von *EC*-Werten für eine Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher Substanzen sogar in komplexen Matrices wie Serum. Das Verfahren unterscheidet zuverlässig zwischen stark toxischen und weniger toxischen Verbindungen, wobei es bei Substanzen mit sehr spezifischem Wirkmechanismus, wie z. B. Neurotoxinen, zu einer Unterbewertung des toxischen Potenzials kommen kann, da die Hefe nicht über die entsprechenden Zielstrukturen verfügt.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung eines auf der Bäckerhefe *S. cerevisiae* basierenden Nachweisverfahrens mit verschiedenen toxikologischen Endpunkten zur Untersuchung von Einzelstoffen und komplexen Umweltproben und die Überprüfung der Funktionalität des Verfahrens.

Zur allgemeinen Bewertung cytotoxischer Potenziale sollte ein auf einem sensitiven Hefestamm basierender Wachstumshemmtest entwickelt werden. Für diesen Wachstumshemmtest wurde ein Protokoll entwickelt und fortlaufend optimiert. Für die Auswertung wurde eine computergestützte Routine entwickelt, die eine nahezu vollständig automatisierte Aufarbeitung der Rohdaten ermöglicht. Das Verfahren wurde sowohl an Einzelstoffen als auch an komplexen Umweltproben getestet und ergab zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse mit geringer Streuung.

Parallel wurde zum Nachweis gentoxischer Potenziale ein auf der transkriptionellen Aktivierung des DNA-Reparaturgens *RAD54* basierendes Verfahren aufgebaut, bei dem die Zunahme eines Fluoreszenzsignals indirekt die Schädigung des DNA-Moleküls anzeigt. Dabei wurde ein Auswerteverfahren eingeführt, das sich nicht an festen Schwellenwerten orientierte, sondern variabel die Streuung der jeweiligen Einzeldaten berücksichtigte. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer eigens erstellten Routine weitgehend automatisiert. Das Verfahren wurde mit verschiedenen Einzelstoffen und komplexen Proben getestet. Die erzielten Daten sind reproduzierbar und spiegeln das toxische Potenzial einer Probe zuverlässig wider.

Über die Aktivität des *PMA1*-Promotors sollte anhand der Abnahme eines Fluoreszenzsignals Substanz vermittelter Stress und dessen Einfluss auf basale Stoffwechselvorgänge

nachgewiesen werden. Das Verfahren wurde bislang an verschiedenen Monosubstanzen getestet. Eine Untersuchung mit Abwasserproben steht noch aus.

6 Ausblick

- Für detailliertere Einblicke in die mechanistische Wirkungsweise einer toxischen Substanz kann das Verfahren um weitere Endpunkte erweitert werden. Denkbar wären Reporter, die z. B. ganz spezifisch oxidativen Stress oder aber spezifische DNA-Schädigungen nachweisen. Ein solcher zusätzlicher Endpunkt wäre z. B. die transkriptionelle Aktivierung des MEC1-Promotors. MEC1p steht an der Spitze der Phosphorylierungskaskade (s. Abb. 1.3), die bei der Reaktion auf DNA-Schaden ausgelöst wird und zu der auch RAD54p gehört. Erste Versuche hierzu wurden bereits durchgeführt. Die geringe Zahl der Ergebnisse und der Versuchswiederholungen erlaubten jedoch noch keine Darstellung im Rahmen dieser Arbeit.
- Die Erweiterung des Verfahrens um weitere sensitive Mutanten (z. B. mit Schwermetall-sensitivität) ließe Aussagen über die Qualität des Schadstoffgehaltes einer unbekannten Probe zu.
- Sengstag *et al.* (1994) zeigten, dass sich die metabolische Kompetenz der Hefe durch heterologe Expression von Genen, die für bestimmte Komponenten des metabolisch aktivierenden Systems der menschlichen Leber kodieren, deutlich erhöhen lässt. Zum besseren Nachweis von Promutagenen und Lebergiften im vorgestellten Hefetest sollte daher in Zukunft eine Mutante verwendet werden, die z. B. CYP1A2 (Cytochrom P450 Oxidase) exprimiert. Durch die parallele Verwendung des bisherigen Sensors und der Mutante mit erweiterter metabolischer Kompetenz ließen sich Mutagene leicht von Promutagenen unterscheiden. Erste Vorversuche wurden in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführt.
- Unterbringung vieler verschiedener Biosensoren auf einer ausreichend großen Mikrottestplatte als *lebender Biochip* zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer toxikologischer Endpunkte. Die unterschiedliche Reaktion der verschiedenen Biosensoren auf eine Verbindung könnte die Erstellung eines für die Substanz charakteristischen Profils ermöglichen.
- Um unter standardisierten Bedingungen untersuchen zu können, wie sich einzelne Monosubstanzen in komplexen Medien wie Abwasser verhalten, kann synthetisches Abwasser verwendet werden. Zwei Rezepte werden dabei vorgeschlagen:

150 mg Harnstoff
800 mg Pepton aus Casein
550 mg Fleischextrakt
ad 1 l deionisiertes Wasser

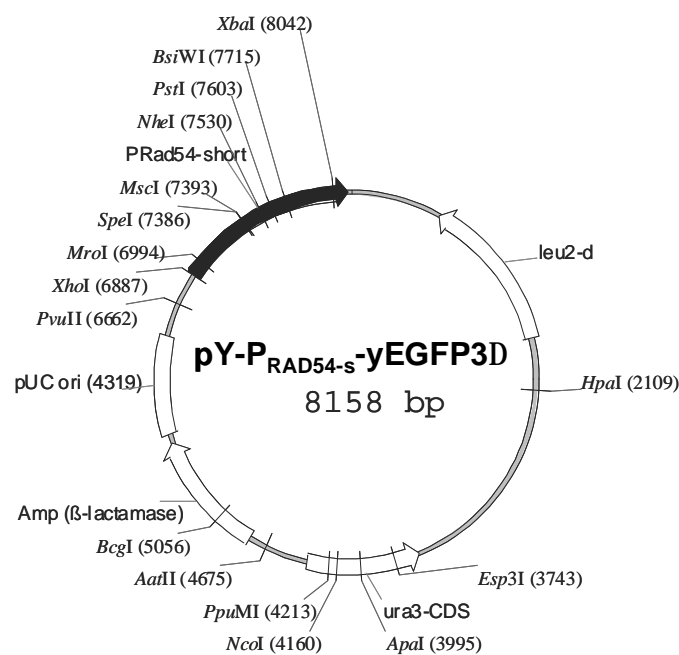
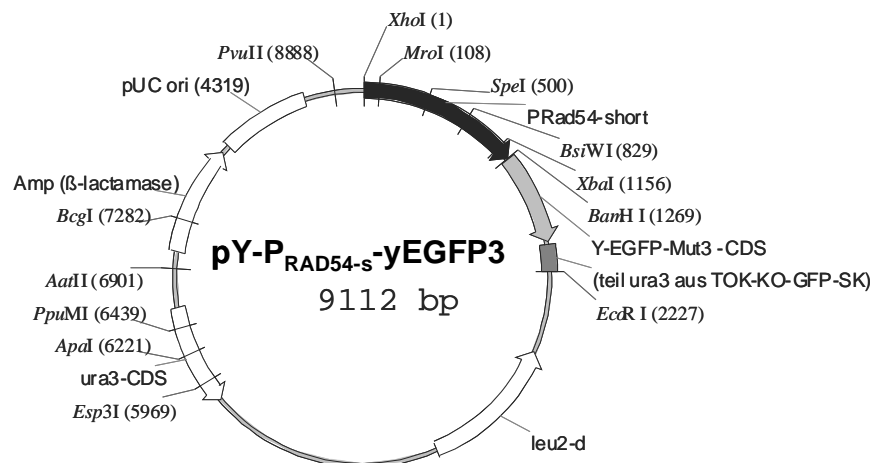
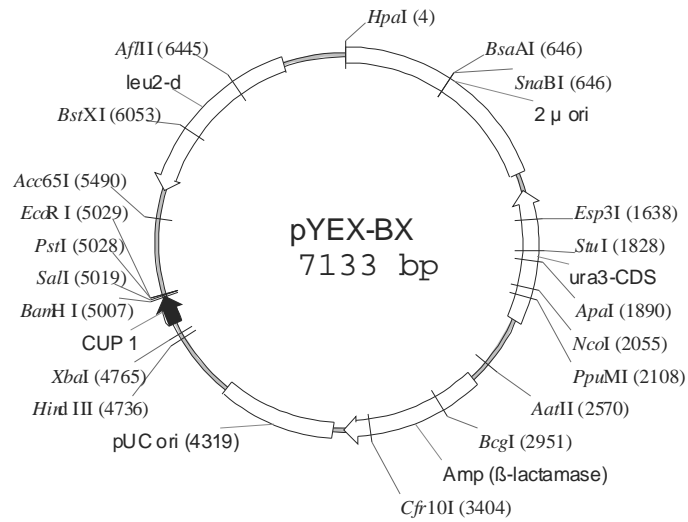
Oder:

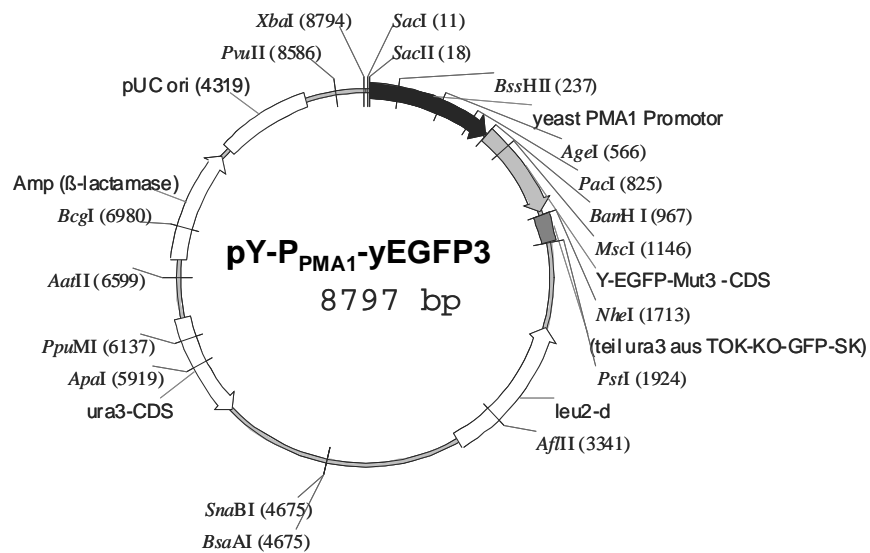
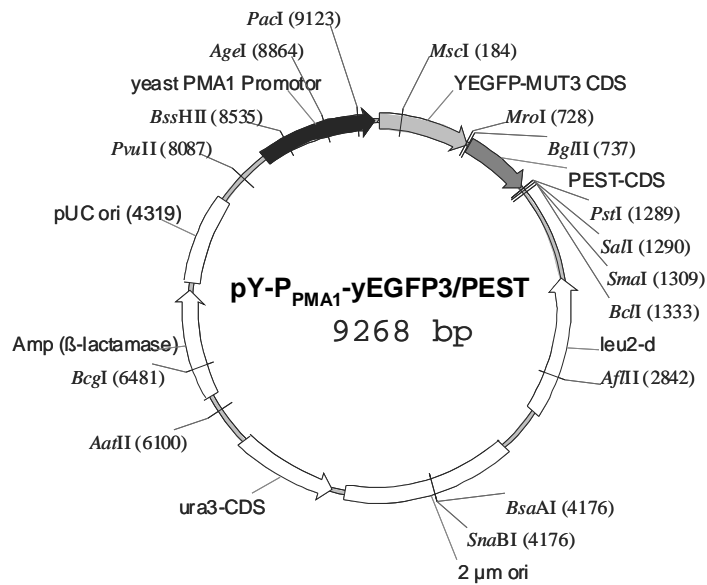
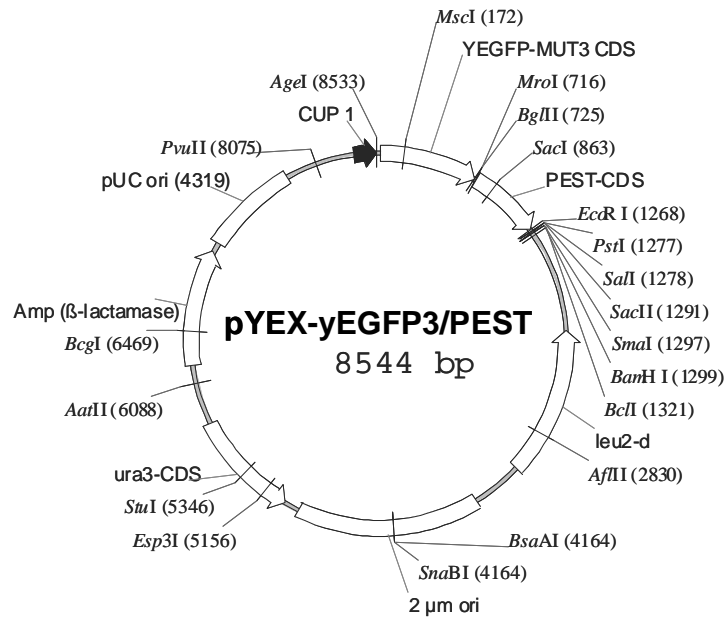
160 mg Pepton aus Casein
110 mg Fleischextrakt
30 mg Harnstoff
4 mg Calciumchlorid-dihydrat
7 mg NaCl
ad 1 l deionisiertes Wasser

Beide Ansätze werden 20 min dampfsterilisiert.

- Zur Erweiterung des Systems um weitere toxikologische Endpunkte möglichst auf einer Mikrotestplatte und zur Erhöhung der möglichen Probenanzahl könnte eine Anpassung des Verfahrens auf Mikrotestplatten mit 256 Kavitäten erfolgen. Dazu müssten zunächst die Eigenschaften der Mikrotestplatte im Sinne der Qualitätssicherung überprüft und anschließend gegebenenfalls die Testprotokolle angepasst werden. Aufgrund der im relativen Verhältnis zum Gesamtvolumen erhöhten Kontaktfläche zwischen Probe und Plattenmaterial ist eine ausreichende Durchmischung der Probe bedingt durch die auftretenden Adhäsionskräfte deutlich erschwert, was eine Erhöhung der Schüttelfrequenz bedingen würde. Darüber hinaus könnten Randeffekte eine deutlich größere Rolle spielen, was einen Einfluss auf die Plattenbelegung hätte. Durch das verringerte Volumen der Ansätze wird auch die absolute Zahl der Biosensoren in der einzelnen Kavität herabgesetzt, was eine ausreichende Empfindlichkeit der Leseinheit voraussetzt und wahrscheinlich die Fehleranfälligkeit des Verfahrens erhöht.
- Ein weiterer Ansatzpunkt zur Fortführung der durchgeführten Arbeiten wäre die Entwicklung von, auch zum Versand geeigneten, Mikrotestplatten mit immobilisierten Hefezellen. Zur Untersuchung einer Probe wäre diese vom Anwender lediglich in den verschiedenen Verdünnungsstufen hinzu zu geben und die Mikrotestplatte nach der entsprechenden Inkubationszeit vor Ort auszulesen. Die so genannte Sol-Gel Technologie böte dafür einen viel versprechenden Ansatz, da diese Art der Immobilisierung bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann, das Gel über eine hohe chemische und biologische Stabilität verfügt und sich durch exzellente Transparenzeigenschaften auszeichnet. Premkumar *et al.* (2001; 2002a; 2002b) beschrieben bereits eine mit Hilfe dieser Technologie erzielten Langzeitimmobilisierung von rekombinanten Leuchtbakterien ohne signifikante Beeinträchtigung der Vitalität oder der physiologischen Eigenschaften des verwendeten Organismus.

Anhang A – Genkarten der verwendeten Plasmide

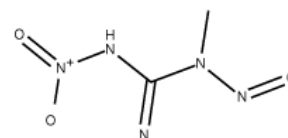




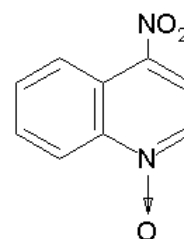
Anhang B – Untersuchte Substanzen

Untersucht wurden Substanzen unterschiedlichster chemischer Natur mit verschiedenartigen toxischen Wirkmechanismen. Mit 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin (MNNG), 4-Nitroquinolin-*N*-oxid (4-NQO), Methyl-Methansulfonat (MMS) und Hydroxyharnstoff wurden vier gentoxische Referenzsubstanzen mit z. T. unterschiedlichen Wirkmechanismen untersucht.

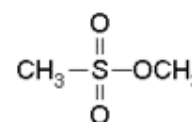
Bei **1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin (MNNG)** handelt es sich um eine alkylierende Verbindung, die Veränderungen an den Basen wie z. B. die des Guanins zu O⁶-Methylguanin oder die des Thymins zu O⁴-Methylthymin verursacht. Aufgrund der bekannten mutagenen und karzinogenen Eigenschaften dieser Substanz bei Tieren ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auch von einer karzinogenen Wirkung im Menschen auszugehen. Genmutationen und andere gentoxische Effekte unter Einfluss dieser Verbindung konnten bereits in Prokaryoten, niederen Eukaryoten und (sowohl *in vitro* als auch *in vivo*) in Säugerzellen nachgewiesen werden. Chromosomale Effekte konnten in niederen Eukaryoten, Pflanzen, Insekten und in Säugerzellen (*in vitro* und *in vivo*) festgestellt werden. Eine metabolische Aktivierung dieser Substanz ist nicht nötig



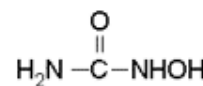
4-Nitroquinolin-*N*-oxid (4-NQO) gehört zu der Gruppe der Hydroxylamine und ist ein bekanntes Karzinogen und Mutagen. Die durch diese Verbindung hervorgerufenen Mutationen beruhen auf einer oxidativen Schädigung der DNA Basen. 4-NQO wird beim Ames Test häufig als Positivkontrollsubstanz verwendet. Mutationen aber auch andere gentoxische Effekte konnten bislang in Prokaryoten, niederen Eukaryoten und in Säugerzellen (*in vitro* und *in vivo*) beobachtet werden. Wie bei MNNG ist eine metabolische Aktivierung der Substanz nicht nötig.



Methyl-Methansulfonat (MMS) ist wie MNNG eine methylierende Verbindung. MMS erzeugt vorwiegend die Addukte N⁷-Methylguanin und N³-Methyladenin. Die bei Tieren nachgewiesenen mutagenen und karzinogenen Eigenschaften dieser Substanz lassen eine karzinogene Wirkung im Menschen vermuten. Gentoxische Effekte konnten *in vivo* und *in vitro* in Prokaryoten, niederen Eukaryoten und Säugerzellkulturen nachgewiesen werden. Für die Ausprägung der gentoxischen Eigenschaften ist keine metabolische Aktivierung erforderlich.



Bei **Hydroxyharnstoff**, einem hydroxylierten Harnstoffmolekül, handelt es sich um ein neoplastisches Medikament. Der Wirkmechanismus dieser Substanz beruht in einer Hemmung der replikativen DNA-Synthese. Dabei



bildet es ein freies Nitroxid-Radikal aus, das an das Tyrosyl-Radikal an der aktiven Stelle der M2-Protein-Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase bindet und somit dieses Enzym inaktiviert. Folglich wirkt diese Substanz speziell in der S-Phase cytotoxisch. Hydroxyharnstoff kann den Zellzyklusarrest sowohl in der G1- als auch in der S-Phase bewirken (Yarbro, 1992). Darüber hinaus verursacht die Substanz Schäden an der DNA, wobei irreversible Veränderungen des Erbgutes auftreten können (Donehower, 1992). In einigen neueren Untersuchungen wird das gentoxische Potenzial dieser Verbindung allerdings als gering eingestuft (de Lima *et al.*, 2003; Hanft *et al.* 2000).

Aus der Gruppe der Schwermetalle wurden Cadmium (Cd^{2+}), Chrom (Cr(VI)), Cobalt (Co^{2+}) und Kupfer (Cu^{2+}) untersucht. Als Schwermetalle werden die Metalle des Periodensystems bezeichnet, die ein spezifisches Gewicht von mehr als 4.5 g/cm^3 (bei manchen Quellen $5,0 \text{ g/cm}^3$) aufweisen. Im Vordergrund der öffentlichen Diskussion und im Fokus der gesetzlichen Regelungen stehen dabei vor Allem die Elemente Blei, Kupfer, Nickel, Quecksilber und Zink. Einige Schwermetalle, wie Eisen, Kupfer, Zink und Mangan erfüllen bei niedrigen Konzentrationen für den Menschen lebensnotwendige Funktionen. Diese Metalle werden als Spurenelemente bezeichnet. Jedoch führen auch diese Spurenelemente bei höheren Konzentrationen zu Wachstums- und Stoffwechselstörungen. Die meisten Schwermetalle haben jedoch bei Stoffwechselprozessen keine erkennbare lebensnotwendige Funktion, sondern wirken bereits bei niedrigsten Konzentrationen giftig auf Mensch, Tier und Pflanze. Im allgemeinen Sprachgebrauch werden mit dem Begriff *Schwermetall* meist toxische, die Umwelt belastende Metalle verbunden. Unter diesen Begriff fallen dann auch das Leichtmetall Aluminium und das Halbmetall Arsen, obwohl diese per definitionem (s. o.) keine Schwermetalle sind. Schwermetalle finden auf vielfältige Weise technische Verwendung und gelangen durch Produktionsabfälle und durch die Anwendung schwermetallhaltiger Produkte und deren Entsorgung in die Umwelt. In Oberflächengewässern finden sich Schwermetalle in gelöster Form, vor allem aber an Schwebstoffe gebunden. Der Eintrag erfolgt dabei über kommunale und industrielle Abwässer, durch Auswaschung oder Abtrag natürlich vorkommender Gesteine und Böden und durch die Auswaschung oder den Abtrag von schwermetallhaltigen Halde, meist ehemaliger Bergbau- und Hüttenbetriebe. Die bedeutendsten industriellen Einleiter sind Betriebe der chemischen Industrie, Metallhütten, Galvanik- und Beizebetriebe. Schwermetalle sind biologisch nicht abbaubar und lagern sich in der Natur im Humus der Böden, in Sedimenten, in der Luft und in den Oberflächengewässern ab. Gelangen die Schwermetalle in die Nahrungskette, kommt es zu einer Anreicherung entlang der Nah-

lungskette. In Fischen werden manche Gifte bis zu 25millionenfach aufkonzentriert. Im allgemeinen ist in den letzten Jahren ein Rückgang der Schwermetallbelastung in den Oberflächengewässern zu verzeichnen; dieser Rückgang ist besonders bei Quecksilber, Cadmium und Chrom festzustellen. Dabei handelt es sich um das Ergebnis zahlreicher, vor allem innerbetrieblicher Vermeidungsmaßnahmen. Die Werte für den Rhein liegen heute praktisch alle in der Größenordnung von Mikrogramm pro Liter, bei Cadmium und Quecksilber sogar deutlich unter einem Mikrogramm pro Liter. Sie unterschreiten damit die für die Trinkwasserverordnung relevanten Grenz- oder Richtwerte. Problematisch bleiben Schwermetalle durch ihre Anreicherung in Sedimenten bei der Verwendung von Baggergut und bei der Kontamination von Überschwemmungsflächen. Die toxische Wirkungsschwelle liegt bei vielen Schwermetallen nur wenig oberhalb der geogenen Hintergrundkonzentration. Grenz- und Richtwerte sind daher an diesen Konzentrationen auszurichten. Die Aufnahme von Schwermetallen beim Menschen erfolgt über die Nahrung (z. B. Quecksilber in Form von Methyl-Hg im Fisch, Cadmium und andere durch Verwendung von schwermetallhaltigen Insektenschutzmitteln bei Obst und Gemüse), über die Atemluft (z. B. Blei und Cadmium durch Autoabgase, Cadmium durch Zigarettenrauch (Herkunft: Verwendung von Pflanzenschutzmitteln und deren teilweise Anreicherung in der Tabakpflanze), Blei über bleihaltige Farben) und über die Haut (z. B. Kupfer in Salben). Schwermetalle gehören zu den wichtigsten zellulären Stressfaktoren überhaupt.

Cadmium, das 48. Element des Periodensystems, und seine Verbindungen werden in Antikorrosionsmitteln, Batterien und Legierungen und als Stabilisator in Kunststoffen und Pigmenten eingesetzt. Anders als z. B. Kupfer besitzt Cadmium keinerlei biologische Funktion und ist daher bereits bei geringen Konzentrationen toxisch. Die Toxizität dieses Schwermetalls beruht auf der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der spezifischen Hemmung verschiedener Enzyme (z. B. Katalase) und einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung. In Tierversuchen erwies sich Cadmium als mutagen und teratogen. In Studien zur Gentoxizität wurde Cadmium als indirekt gentoxisch eingestuft. Die Gentoxizität des Metalls beruht auf der Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen und der Entstehung von ROS (Waisberg *et al.*, 2003; Risso-de Faverney *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2001; Beyersmann und Hechtenberg, 1997; Brennan und Schiestl, 1996; Beyersmann, 1994; Hartwig, 1994; Koizumi *et al.*, 1992).

Chrom, das 24. Element des Periodensystems, kann in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen. Die am häufigsten vorgefundenen Formen sind dabei das trivalente Chrom – Cr(III) – und das hexavalente Chrom – Cr(VI). Die hexavalente Form des Elementes verfügt im Gegensatz zur trivalenten über keinerlei biologische Funktionen. So ist Chrom (VI) weit-

aus toxischer als Chrom (III), sowohl bei akuter als auch bei chronischer Einwirkung. Eine Vielzahl von Studien hat die Karzinogenität des hexavalenten Chroms für den Menschen belegt (IARC, 1990; Langard, 1990). Die Fähigkeit von Chrom, die Bildung von Tumoren hervorzurufen, konnte in vielen Untersuchungen an Tieren bestätigt werden (IARC, 1990). Die Gentoxizität von Cr(VI) wurde in Untersuchungen an tierischen Zellen anhand der Induktion von Chromosomenschädigungen (Sen *et al.*, 1987), Zelltransformationen (Biedermann und Landolph, 1990) und anhand von Mutagenitätstests (De Flora *et al.*, 1990) belegt. Die Karzinogenität von Cr(VI) basiert nach gegenwärtiger Meinung auf der Induktion von DNA-Schäden. Unter physiologischen Bedingungen liegt Cr(VI) vorwiegend als Chromatanion vor (CrO_4^{2-}), welches jedoch selbst nicht für die Schädigung der DNA verantwortlich ist. Nachdem Cr(VI) über nichtspezifische Anionenkanäle in die Zelle gelangt ist, wird es über einen nicht enzymatischen, reduktiven Stoffwechselweg in die stabile trivalente Form umgewandelt (Dillon *et al.*, 1997). Dabei entstehen neben verschiedenen anderen reaktiven Nebenprodukten auch vorübergehend Cr(IV) und Cr(V) (Stearns *et al.*, 1995; Stearns und Wetterhahn, 1994; Aiyar *et al.*, 1989). Die metabolische Umwandlung der hexavalenten in die trivalente Form kann zu oxidativen Schädigungen, wie DNA Strangbrüchen und dem Verlust einzelner Basen (Casadevall und Kortenkamp, 1995; da Cruz Fresco und Kortenkamp, 1994; Sugiyama *et al.*, 1986), aber daneben auch zu einer Cr(III) vermittelten Quervernetzung von Glutathion bzw. verschiedenen Aminosäuren mit dem Phosphatrückgrat der DNA führen, welche vorwiegend die Substitution einzelner Basen verursacht (Voitkun *et al.*, 1998).

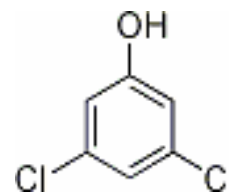
Das 29. Element des Periodensystems, **Kupfer**, übernimmt als Spurenelement essentielle Funktionen bei einer Vielzahl biologischer Prozesse. Im Menschen ist Kupfer an der Energieproduktion in den Mitochondrien, dem Transport von Eisen ins Knochenmark, an der Synthese von Kollagen und Elastin im Bindegewebe, an der Synthese der Nebennierenmarkhormone Adrenalin und Noradrenalin, am Abbau der Hormone Histamin, Dopamin und Serotonin, am Aufbau des Hautfarbstoffes Melanin beteiligt und ist Bestandteil der Kupfer-Zink-Superoxyddismutase. Kupfer verfügt jedoch auch über toxische Eigenschaften, welche vorwiegend auf einer Blockade des Enzymsystems durch unkontrollierte Komplexbildung beruhen. Darüber hinaus verursacht Kupfer bei erhöhten Konzentrationen die Bildung von ROS. Im Menschen verhindert der rasche Einbau von Kupfer in kupferabhängige Proteine die Akkumulation von freiem Kupfer im Körper. Prokaryotische Organismen verfügen nicht über die entsprechende Proteinausstattung und reagieren daher wesentlich empfindlicher auf Kupfer, weswegen Kupferverbindungen bereits früh im Obst-, Wein-, Hopfen- und Kartoffelanbau als Pflanzenschutzmittel Verwendung fanden.

In verschiedenen Studien wurden bereits gentoxische Eigenschaften von Kupferionen (Cu^{2+}) nachgewiesen (Cavas *et al.*, 2005; Guecheva *et al.*, 2001; Bolognesi *et al.*, 1999; Codina *et*

al., 1995). Die Gentoxizität ist auf die Inhibierung von DNA-Reparaturmechanismen und die Bildung von Hydroxyl-Radikalen zurückzuführen.

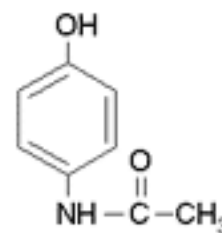
Das Element **Cobalt** mit der Ordnungszahl 27 und seine Verbindungen werden industriell zum Beispiel bei der Herstellung von Legierungen und spezieller Edeltahle verwendet. Als Cofaktor des Vitamins B12 und als Bestandteil von an der Protein- und Nucleinsäuresynthese beteiligten Enzymen ist Cobalt ein für den menschlichen Organismus essentielles Spurenelement. Aufgrund seiner biologischen Funktion verfügt das Element über ein vergleichsweise geringes toxisches Potenzial. Mutagene Eigenschaften des Metalls konnten in *in vitro* Studien mit tierischen und menschlichen Zellen nachgewiesen werden. In mikrobiellen Testsystemen ließen sich diese jedoch bislang nicht nachweisen. Die (schwache) Toxizität von Cobalt beruht auf der Entstehung von ROS und dem Verdrängen von essentiellen Zink- bzw. Magnesiumionen verschiedener Proteine.

3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP) ist ein in der chemischen Industrie weit verbreitetes Vorprodukt zur Herstellung von Agrochemikalien (Fungizide, Bakterizide und Algizide) sowie anderen Verbindungen. Die toxischen Eigenschaften von 3,5-DCP beruhen vorwiegend auf der Hemmung der Zellatmung und einer Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels. Aufgrund einer guten Löslichkeit dieser organischen Verbindung in Wasser und der hohen Umweltrelevanz (→ Umweltrelevanz) dieses Stoffes wird 3,5-DCP häufig als Referenzsubstanz bei Wachstumshemmtests verwendet. Über gentoxische Eigenschaften von 3,5-DCP ist nichts bekannt.

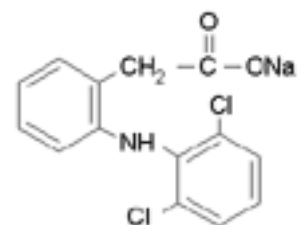


Aus der Gruppe der pharmazeutisch wirksamen Substanzen wurden das Schmerzmittel Acetaminophen (Paracetamol) und das entzündungshemmende Medikament Diclofenac untersucht. Medikamentenrückstände aus der Human- und Tiermedizin werden in Klärwerksabläufen und in Oberflächengewässern in hohen Mengen gefunden. Diclofenac und Acetaminophen gehören dabei zu den am häufigsten vorgefundenen Verbindungen (Schwaiger *et al.*, 2004).

Acetaminophen (Paracetamol) ist ein bekanntes und frei verfügbares Schmerz- und Fiebermittel, das seit den 50er Jahren erhältlich ist. Obwohl bis heute nicht vollständig aufgeklärt, scheint die Hauptwirkung von Acetaminophen (Paracetamol) in einer Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) im Rückenmark zu liegen. Dieses Enzym ist über die Bildung von Prostaglandinen maßgeblich an der Schmerzweiterleitung ins Gehirn beteiligt. Andere Wirkungen betreffen die Serotonin-Rezeptoren (Typ 5-HT₃) im Rückenmark (über diesen Rezeptortyp kann das Gehirn die Weiterleitung von Schmerz hemmen) und die Glutamat-NMDA-Rezeptoren im Gehirn (viele Schmerz verarbeitende Gehirnzellen besitzen diesen Rezeptortyp). Anders als z. B. Diclofenac hemmt Acetaminophen das aktive Zentrum von COX jedoch nur indirekt (Stada Arzneimittel AG). Bei therapeutischen Dosen (Plasmakonzentration 10–20 mg/l) wird Acetaminophen zu Stoffwechselprodukten abgebaut, die rasch über den Urin ausgeschieden werden. Ein kleiner Teil der Substanz wird durch verschiedene P450-Enzyme (CYP2E1, CYP1A2 und CYP3A4) metabolisch aktiviert, wodurch die reaktive Substanz N-Acetyl-p-Benzoquinonimin (NAPQI) entsteht (Thummel *et al.*, 1993; Raucy *et al.*, 1989). Unter normalen Bedingungen erfolgt in der Leber die rasche Inaktivierung von NAPQI durch spontane Reaktion mit Glutathion. Bei Überdosierung erschöpft sich der Glutathionvorrat jedoch, so dass es zu einer Anhäufung von NAPQI kommt. Diese reaktive Verbindung kann Proteine oxidieren aber auch kovalent modifizieren (Park *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 1974). Die Toxizität von Acetaminophen konnte auch in Hefen nachgewiesen werden (Srikanth *et al.*, 2005). Hefezellen, die unter Anwesenheit von Acetaminophen wachsen, zeigen eine intrazelluläre Akkumulation dieser Substanz. Metabolite konnten in den entsprechenden Zellextrakten jedoch nicht nachgewiesen werden. Anders als in Säugern scheinen die Cytochrom P450-Enzyme der Hefe, Erg5p und Erg11p, nicht an der Ausprägung der toxischen Eigenschaften von Acetaminophen beteiligt zu sein. Auch scheint der Glutathionvorrat in Hefe keine zentrale Rolle für die Toxizität dieses Arzneimittels zu spielen, was einen völlig anderen Mechanismus der Toxizität vermuten lässt (Srikanth *et al.*, 2005).



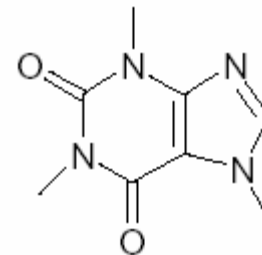
Diclofenac ist ein häufig verschriebenes, nicht steroidales, entzündungshemmendes Medikament (NSAID, *nonsteroidal antiinflammatory drugs*). Die schmerzstillende Wirkung von Diclofenac beruht auf einer direkten Hemmung des aktiven Zentrums der Cyclooxygenase-2 (COX-2). Medikamente dieser Wirkstoffklasse werden mit Beeinträchtigungen der Leberfunktion in Verbindung gebracht, wobei die entsprechenden Mechanismen komplex sind und von vielen Faktoren beeinflusst werden, die nicht vollständig aufgeklärt sind. Cytotoxische Konzentrationen von Diclofenac verursachen mitochondriale



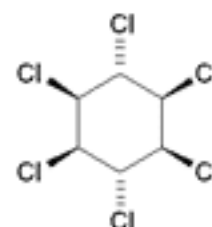
Fehlfunktionen wie verringertem (Mitochondrien-) Membranpotenzial und reduziertem ATP-Spiegel (Bort *et al.*, 1998).

Koffein ist die weltweit am weitesten verbreitete neuroaktive Droge.

Die Substanz ist ein Antagonist des Adenosin-Rezeptors und ein Inhibitor der cAMP-Phosphodiesterase. Daher steigt der zelluläre cAMP-Spiegel nach Verabreichung von Koffein. Darüber hinaus beeinflusst Koffein den zellulären Calciumspiegel, indem es Calcium aus intrazellulären Kompartimenten freisetzt. Gentoxische Eigenschaften dieser Substanz beruhen auf einer Hemmung zellulärer DNA-Reparaturmechanismen.



Als Organochlorverbindung gehört **Lindan** zu einer der ältesten Klassen von Pestiziden. Nur wenige Wirkstoffe aus dieser Klasse sind heute noch im Einsatz. Die (spezifische) Wirkungsweise von Lindan ist im wesentlichen auf seine neurotoxischen Eigenschaften zurückzuführen, die wie bei den meisten anderen Pestiziden dieser Klasse



auf einer Beeinflussung der elektrophysiologischen und, damit verbunden, der enzymatischen Eigenschaften der Membranen von Nervenzellen beruhen. Verursacht wird das zum einen durch eine Störung des Transports von Natrium- und Kaliumkationen am Axon der Neuronen aufgrund einer Inhibierung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Ratra *et al.*, 2001; MacPhail *et al.*, 1999). Zum anderen kommt es zu einer Beeinflussung des Gamma-Aminobuttersäure-Systems (GABA) durch Interaktion mit der Picrotoxin Bindestelle des GABA-A Rezeptorkomplexes im zentralen Nervensystem (Ratra *et al.*, 2001; Casida, 1993; Gant *et al.*, 1987). Insgesamt kommt es dadurch zu einer erhöhten neuronalen Reizbarkeit und zur Ausprägung von Krämpfen, die bis hin zu Atemstillstand führen können. Gentoxische Effekte durch die Einwirkung von Lindan konnten bereits in tierischen Zellen nachgewiesen werden (Pool-Zobel *et al.*, 1993; Bhunya und Jena, 1992).

Natriumchlorid ist eine für den Stoffwechsel essentielle Verbindung, die jedoch bei hohen Konzentrationen toxisch wirkt. Salzkonzentrationen von mehr als 0,3 M (entspricht etwa 17,6 g/l) führen zu einer Störung der elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen, die für die Ausbildung der räumlichen Struktur von Proteinen verantwortlich sind. Darüber hinaus werden einige Enzyme auch spezifisch durch Na^+ oder Cl^- gehemmt. Das mutagene Potenzial von Kochsalz wurde bereits in Säugerzellen (Kültz und Chakravarty, 2001; Gallo-way *et al.*, 1987) und in Hefe (Parker und Borstel, 1990) nachgewiesen. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind gegenwärtig nicht eindeutig geklärt.

Anhang C – Vergleichsdaten

Substanz	Kurzbeschreibung	Wert in mg/l	Endpunkt/Dauer	Organismus	Beschreibung	Parameter	Referenz
Acetaminophen	Arzneimittel	555	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		1425	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		814	LC ₅₀ 96h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Broderius <i>et al.</i> (1995)
		13	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Kuhn <i>et al.</i> (1989)
		9,2	EC ₅₀ 48h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Kuhn <i>et al.</i> (1989)
		55,5	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Calleja <i>et al.</i> (1994 a)
		29,6	LC ₅₀ 24h	<i>Streptocephalus prosocideus</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Calleja <i>et al.</i> (1994 a)
		136,1	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia pulex</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Lilius <i>et al.</i> (1995)
		577,6	LC ₅₀ 24h	<i>Artemia salina</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Calleja <i>et al.</i> (1994 a)
		5307	LC ₅₀ 24h	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Rädertier	Mortalität	Calleja <i>et al.</i> (1994 a)
		3750	LC ₅₀ 24h	<i>Brachionus plicatilis</i>	Rädertier	Mortalität	Calleja <i>et al.</i> (1992)
		330,8	IC ₅₀ 5min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		2342	IC ₅₀ 5min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		6019	IC ₅₀ 18 h	<i>Escherichia coli</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		6019	IC ₅₀ 18 h	<i>Bacillus subtilis</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		40,7	IC ₅₀ 24 h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		5243	IC ₅₀ 24 h	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Rädertier	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		561,8	IC ₅₀ 24h	<i>Artemia salina</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		29,48	IC ₅₀ 24h	<i>Streptocephalus prosocideus</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		1121	IC ₅₀ 18h	Pollenschläuche	Pflanze	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		407	IC ₅₀ 72h	<i>Allium cepa</i>	Pflanze	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		1022	IC ₅₀ 5min	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996b)
		1201	IC ₅₀ 15min	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996b)
		1258	IC ₅₀ 15min	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996b)
		50	EC ₅₀ 48 h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Henschel <i>et al.</i> (1997)
		134	EC ₅₀ 72 h	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Alge	Wachstumshemmung	Henschel <i>et al.</i> (1997)
		378	EC ₅₀ 48 h	<i>Brachydanio rerio</i>	Fisch	Mortalität	Henschel <i>et al.</i> (1997)
Cadmium (Cd ²⁺)	Schwermetall	0,18	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		0,8	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		6,5	EC ₂₀ 3h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		2,5	EC ₂₀ 4h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		5,1	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		6,8	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		15,2	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		18,1	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		1,1	EC ₂₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		1,8	EC ₂₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		2,0	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		1,58	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		4,2	EC ₅₀ 30min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		8,0	EC ₅₀ 60min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		10,0	EC ₅₀ 90min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		8,2	EC ₅₀ 120min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		0,39	EC ₅₀	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Reinke <i>et al.</i> (1995)

Substanz	Kurzbeschreibung	Wert in mg/l	Endpunkt/Dauer	Organismus	Beschreibung	Parameter	Referenz
Chrom (Cr(VI))	Schwermetall	23,2	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Gellert <i>et al.</i> (2000)
		4,0	EC ₅₀ 36h	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Ciliat	Wachstumshemmung	Sauvant <i>et al.</i> (1995)
		11,2	EC ₅₀	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Clemens <i>et al.</i> (2002)
		69,7	EC ₅₀	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Gadd <i>et al.</i> (1986)
		0,27	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		0,88	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		2,9	EC ₂₀ 3h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		2,0	EC ₂₀ 4h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		3,5	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		3,0	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		8,0	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		6,3	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		0,93	EC ₂₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		0,76	EC ₂₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		2,2	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		2,7	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		4,1	EC ₅₀ 30min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		2,8	EC ₅₀ 60min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		2,5	EC ₅₀ 90min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		2,2	EC ₅₀ 120min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		15,9	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Gellert (2000)
		75,0	EC ₅₀ 36h	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Ciliat	Wachstumshemmung	Sauvant <i>et al.</i> (1995)
		400,1	IC ₅₀ 6 min	<i>Aspergillus awamori</i>	Schimmelpilz	Calciumspiegel	Kozlova <i>et al.</i> (2005)
		167,9	IC ₅₀ 30 min	<i>Aspergillus awamori</i>	Schimmelpilz	Calciumspiegel	Kozlova <i>et al.</i> (2005)
Cobalt (Co ²⁺)	Schwermetall	19,0	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		82,9	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		1,5	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		1,4	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		3,3	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		3,0	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		0,65	EC ₂₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		0,81	EC ₂₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		0,98	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		1,0	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		16,0	LC ₅₀ 4d	<i>E. subvaria</i>	Insekt	Mortalität	Warnick <i>et al.</i> (1969)
		1,62	LC ₅₀ 48h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs		Biesinger <i>et al.</i> (1972)
		1,11	LC ₅₀ 48h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs		Biesinger <i>et al.</i> (1972)
		2,11	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Khengarot <i>et al.</i> (1987)
		1,49	EC ₅₀ 48h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Khengarot <i>et al.</i> (1987)
		3,2	LC ₅₀ 96h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs		Ewell <i>et al.</i> (1986)
		2,61	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Khengarot <i>et al.</i> (1989)
		1,49	EC ₅₀ 48h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Khengarot <i>et al.</i> (1989)
		1,32	EC ₅₀ 48h	<i>Daphnia hyalina</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Baudouin <i>et al.</i> (1974)
		15,5	LC ₅₀ 48h	<i>Cyclops abyssorum</i>			Baudouin <i>et al.</i> (1974)
		4,0	LC ₅₀ 48h	<i>Eudiaptomus padanus</i>	Insekt		Baudouin <i>et al.</i> (1974)
		2,35	LC ₅₀ 24h	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		4,6	LC ₅₀ 24h	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		4,2	LC ₅₀ 24h	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		>5,3	LC ₅₀ 24h	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		0,088	LC ₅₀ 48h	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		8,8	LC ₅₀ 96h	<i>Austropota mobius</i>	Flusskrebs	Mortalität	Boutet <i>et al.</i> (1973)
		10,2	LC ₅₀ 96h	<i>Orconectes limosus</i>	Flusskrebs	Mortalität	Boutet <i>et al.</i> (1973)

Substanz	Kurzbeschreibung	Wert in mg/l	Endpunkt/Dauer	Organismus	Beschreibung	Parameter	Referenz
		27,8	EC ₅₀ 24h	<i>Philodina acuticornis</i>	Rädertier	Immobilisation	Buikema <i>et al.</i> (1974)
		183	EC ₅₀ 48h	<i>Philodina acuticornis</i>	Rädertier	Immobilisation	Buikema <i>et al.</i> (1974)
		59,0	EC ₅₀ 96h	<i>Philodina acuticornis</i>	Rädertier	Immobilisation	Buikema <i>et al.</i> (1974)
		3,49	LC ₅₀ 240h	<i>Dugesia tigrina</i>	Planaria	Mortalität	Solski & Piontek (1987)
		447,7	EC ₅₀ 24h	<i>Tubifex tubifex</i>	Ringelwurm	Immobilisation	Khengarot (1991)
		447,7	EC ₅₀ 48h	<i>Tubifex tubifex</i>	Ringelwurm	Immobilisation	Khengarot (1991)
		139,3	EC ₅₀ 96h	<i>Tubifex tubifex</i>	Ringelwurm	Immobilisation	Khengarot (1991)
		25,0	LC ₅₀ 96h	<i>Dugesia tigrina</i>	Strudelwurm	Mortalität	Ewell <i>et al.</i> (1986)
		32,0	LC ₅₀ 8d	<i>Acronuria lycorias</i>	Insekt	Mortalität	Warnick <i>et al.</i> (1969)
		32,0	LC ₅₀ 7d	<i>Hydropsyche betteni</i>	Insekt	Mortalität	Warnick <i>et al.</i> (1969)
		24,0	EC ₅₀ 36h	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Ciliat	Wachstumshemmung	Sauvant <i>et al.</i> (1995)
		167	LC ₅₀ 48h	<i>Crangonyx pseudogracilis</i>	Flohkrebs	Mortalität	Martin & Holdich (1986)
		39,2	LC ₅₀ 96h	<i>Crangonyx pseudogracilis</i>	Flohkrebs	Mortalität	Martin & Holdich (1986)
		1,406	LC ₅₀ 96h	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fisch	Mortalität	Marr <i>et al.</i> (1998)
		0,52	LC ₅₀ 144h	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fisch	Mortalität	Marr <i>et al.</i> (1998)
		0,533	LC ₂₀ 96h	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fisch	Mortalität	Marr <i>et al.</i> (1998)
		0,228	LC ₂₀ 144h	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fisch	Mortalität	Marr <i>et al.</i> (1998)
		0,81	LC ₅₀ 7d	<i>Carassius auratus</i>	Fisch	Mortalität	Birge (1978)
		0,05	LC ₅₀ 7d	<i>Gastrophryne carolinensis</i>	Fisch	Mortalität	Birge (1978)
		3,61	LC ₅₀ 96h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Kimball (1978)
		>5,83	LC ₅₀ 48h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		1,245	NOEC 48h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		7,28	NOEC 48h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		13,733	NOEC 48h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		6,2	NOEC 48h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Diamond <i>et al.</i> (1992)
		48,0	LC ₅₀ 96h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Ewell <i>et al.</i> (1986)
		32,2	LC ₅₀ 96h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Curtis & Ward <i>et al.</i> (1981)
		91,9	LC ₅₀ 96h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Curtis <i>et al.</i> (1979)
		225	LC ₅₀ 96h	<i>Colisa fasciatus</i>		Mortalität	Srivastava & Agrawal (1979)
		1,473	EC ₅₀ 101h	<i>Xenopus laevis</i>	Amphibium	Missbildung	Sunderman (1992)
		612,9	LC ₅₀ 101h	<i>Xenopus laevis</i>	Amphibium	Mortalität	Sunderman (1992)
		2,475	LOEC 101h	<i>Xenopus laevis</i>	Amphibium	Wachstumshemmung	Sunderman (1992)
		0,55	NOEC 21d	<i>Chlorella vulgaris</i>	Grünalge	Wachstumshemmung	Coleman <i>et al.</i> (1971)
		1,55	LOEC 21d	<i>Chlorella vulgaris</i>	Grünalge	Wachstumshemmung	Coleman <i>et al.</i> (1971)
		0,522	EC ₅₀ 96h	<i>Chlorella vulgaris</i>	Grünalge	Wachstumshemmung	Rachlin <i>et al.</i> (1993)
		0,55	LOEC 21d	<i>Pediastrum tetras</i>	Alge	Wachstumshemmung	Coleman <i>et al.</i> (1971)
		0,55	LOEC 21d	<i>Euglena viridis</i>	Alge	Wachstumshemmung	Coleman <i>et al.</i> (1971)
		23,8	EC ₅₀ 96h	<i>Spirulina platensis</i>	Alge	Wachstumshemmung	Sharma <i>et al.</i> (1987)
		14,4	EC ₅₀ 120h	<i>Spirulina platensis</i>	Alge	Wachstumshemmung	Sharma <i>et al.</i> (1987)
		10,9	EC ₅₀ 144h	<i>Spirulina platensis</i>	Alge	Wachstumshemmung	Sharma <i>et al.</i> (1987)
		8,13	EC ₅₀ 168h	<i>Spirulina platensis</i>	Alge	Wachstumshemmung	Sharma <i>et al.</i> (1987)
		0,5	LOEC 14d	<i>Chlamydomonas eugametos</i>		Wachstumshemmung	Hutchinson (1973)
		0,01	LOEC 10d	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Reproduktion	Kimball (1978)
		<0,0044	NOEC 28d	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Reproduktion	Kimball (1978)
		>0,0054	LOEC 28d	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Reproduktion	Kimball (1978)
		1,86	EC ₅₀ 96h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Reproduktion	Kimball (1978)
Coffein	ZNS Stimulans	250	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		641	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		579/417	EC ₂₀ 3h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		570/379	EC ₂₀ 4h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		151	LC ₅₀ 96h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Russom <i>et al.</i> (1997)
		160	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Calleja <i>et al.</i> (1994 b)
		410	LC ₅₀ 24h	<i>Streptocephalus proboscideus</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Calleja <i>et al.</i> (1994 b)

Substanz	Kurzbeschreibung	Wert in mg/l	Endpunkt/Dauer	Organismus	Beschreibung	Parameter	Referenz
		684	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Lilius <i>et al.</i> (1994)
		3457	LC ₅₀ 24h	<i>Artemia salina</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Calleja <i>et al.</i> (1994 b)
		4661	LC ₅₀ 24h	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Rädertier	Mortalität	Calleja <i>et al.</i> (1994 b)
		673	IC ₅₀ 5min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		2129	IC ₅₀ 5min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		15426	IC ₅₀ 18h	<i>Escherichia coli</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		8096	IC ₅₀ 120h	<i>Halobacterium halobium</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		689	IC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		158	IC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		4659	IC ₅₀ 24h	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Rädertier	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		3453	IC ₅₀ 24h	<i>Artemia salina</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		406	IC ₅₀ 24h	<i>Streptocephalus prosocideus</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		560	IC ₅₀ 18h	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Pflanze	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		117	IC ₅₀ 72h	<i>Allium cepa</i>	Pflanze	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		266	LOEC 16-20h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Cahill <i>et al.</i> (2004)
Diclofenac	Arzneimittel	115,7	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		246,6	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		170,6	EC ₂₀ 3h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		140,7	EC ₂₀ 4h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		14,5	EC ₅₀ 96 h	<i>Synechococcus leopoldensis</i>	Alge	Wachstumshemmung	Ferrari <i>et al.</i> (2004)
		22,4	EC ₅₀ 48 h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Ferrari <i>et al.</i> (2004)
		14,5	EC ₅₀ 96 h	<i>Synechococcus leopoldensis</i>	Alge	Wachstumshemmung	Ferrari <i>et al.</i> (2004)
		10	NOEC 96h	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alge	Wachstumshemmung	Ferrari <i>et al.</i> (2004)
		20	LOEC 96 h	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alge	Wachstumshemmung	Ferrari <i>et al.</i> (2004)
		16,3	EC ₅₀ 96 h	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alge	Wachstumshemmung	Ferrari <i>et al.</i> (2004)
3,5-Dichlorphenol	Chloriniertes Phenol	5,51	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		9,23	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		6,30	EC ₂₀ 3h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		6,27	EC ₂₀ 4h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		5,32	EC ₅₀	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Phytoplankton	Wachstumshemmung	Christensen & Nyholm (1984)
		5,87	EC ₅₀	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Phytoplankton	Wachstumshemmung	Christensen & Nyholm (1984)
		6,1	EC ₅₀	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Phytoplankton	Wachstumshemmung	Christensen & Nyholm (1984)
		25	IC ₅₀ 30min	<i>Bacillus sp.</i>	Bakterium	Kohlenstoff-Reduktion	Liu <i>et al.</i> (1982)
		2,77	EC ₅₀ 30min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Lichtemission	Ribo <i>et al.</i> (1983)
		30,2	IC ₅₀ 3h	Belebtschlamm*	Bakterien	Sauerstoffverbrauch	Dutka & Kwan (1984)
		7,0	EC ₅₀	Belebtschlamm*	Bakterien	Sauerstoffverbrauch	King (1984)
		2,9	EC ₅₀ 15min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Lichtemission	Dutka & Kwan (1984)
		3,2	EC ₅₀ 18h	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Dutka & Kwan (1984)
		58,3	IC ₅₀	Belebtschlamm*	Bakterien	Phenolbiodegradation	Beltrame <i>et al.</i> (1984)
		2,09	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Devillers & Chambon (1986)
		4,7	LC ₅₀ 24h	<i>Poecilia reticulatus</i>	Fisch	Mortalität	Könemann & Musch (1981)
		2,6	LC ₅₀ 24h	<i>Poecilia reticulatus</i>	Fisch	Mortalität	Könemann & Musch (1981)
		6,1	LC ₅₀ 24h	<i>Lebistes reticulatus</i>	Fisch	Mortalität	Benoit-Guyod <i>et al.</i> (1984)
		1,3	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		1,6	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		2,7	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		2,8	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		23,39	EC ₅₀ 15min	<i>Synechocystis sp.</i>	Cyanobakterium	Biolumineszenz	Shao <i>et al.</i> (2002)
		46,7	IC ₅₀ 6 min	<i>Aspergillus awamori</i>	Schimmelpilz	Calciumspiegel	Kozlova <i>et al.</i> (2005)
		36,7	IC ₅₀ 6 min	<i>Aspergillus awamori</i>	Schimmelpilz	Calciumspiegel	Kozlova <i>et al.</i> (2005)
		12,5	LOEC 16-20h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Cahill <i>et al.</i> (2004)

Substanz	Kurzbeschreibung	Wert in mg/l	Endpunkt/Dauer	Organismus	Beschreibung	Parameter	Referenz
Kupfer (Cu ²⁺)	Schwermetall	0,74	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		2,52	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		7,0/n.c.	EC ₂₀ 3h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		2,9/n.c.	EC ₂₀ 4h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		24,7	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		27,4	EC ₂₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		38,7	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		39,0	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		0,1	EC ₂₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		0,1	EC ₂₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		0,2	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		0,3	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Schmitz <i>et al.</i> (1998)
		14,6	EC ₅₀	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Gadd <i>et al.</i> (1986)
		0,39	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Reinke <i>et al.</i> (1995)
		1,05	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Slabbert <i>et al.</i> (1986)
		9,5	EC ₂₀ 16h	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Torslov (1993)
		12,7	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Torslov (1993)
		0,3	EC ₂₀ 5h	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Dehydrogenase Aktivität	Torslov (1993)
		3,9	EC ₅₀ 5h	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Dehydrogenase Aktivität	Torslov (1993)
		> 18,0	EC ₂₀ 5h	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Esterase Aktivität	Torslov (1993)
		> 18,0	EC ₅₀ 5h	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Esterase Aktivität	Torslov (1993)
		17,0	EC ₅₀ 16h	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Duttka <i>et al.</i> (1981)
		14,0	EC ₅₀ 30min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		14,0	EC ₅₀ 60min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		18,0	EC ₅₀ 90min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		18,0	EC ₅₀ 120min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Paran <i>et al.</i> (1990)
		36,8	EC ₅₀ 7h	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Gellert <i>et al.</i> (1999)
		53,0	EC ₅₀ 36h	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Ciliat	Wachstumshemmung	Sauvant <i>et al.</i> (1995)
		0,635	IC ₅₀ 15min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		34,9	IC ₅₀ 5min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		191,8	IC ₅₀ 18h	<i>Escherichia coli</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		191,8	IC ₅₀ 18h	<i>Bacillus subtilis</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		0,07	IC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		0,07	IC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		0,02	IC ₅₀ 24h	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Rädertier	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		0,62	IC ₅₀ 24h	<i>Artemia salina</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		0,05	IC ₅₀ 24h	<i>Streptocephalus prosocideus</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		14,9	IC ₅₀ 18h	<i>Nicotiana glauca</i>	Pflanze	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		0,17	IC ₅₀ 72h	<i>Allium cepa</i>	Pflanze	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		39,2	IC ₅₀ 5min	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996b)
		33,3	IC ₅₀ 15min	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996b)
		27,1	IC ₅₀ 15min	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996b)
Lindan	Insektizid	3,14	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		8,28	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		5,47	EC ₂₀ 3h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		5,63	EC ₂₀ 4h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		0,11	EC ₅₀	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Macek <i>et al.</i> (1976)
		0.0008	EC ₅₀	<i>C. riparius</i>	Insekt		Maud <i>et al.</i> (1992)
		6362	IC ₅₀ 5min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		60,8	IC ₅₀ 5min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		4108	IC ₅₀ 120h	<i>Halobacterium halobium</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		14,6	IC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		1,64	IC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Clemedson <i>et al.</i> (1996)

Substanz	Kurzbeschreibung	Wert in mg/l	Endpunkt/Dauer	Organismus	Beschreibung	Parameter	Referenz
MNNG	Gentoxin	3417	IC ₅₀ 24h	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Rädertier	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		14,6	IC ₅₀ 24h	<i>Artemia salina</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		3923	IC ₅₀ 24h	<i>Streptocephalus prosocides</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		14,9	IC ₅₀ 18h	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Pflanze	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		0,32	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		0,9156	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		0,56	EC ₂₀ 3h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		0,48	EC ₂₀ 4h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		0,5	EC ₅₀	<i>Salmonella typhimurium</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Baun <i>et al.</i> (1999)
		0,57	LOEC 16-20h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Cahill <i>et al.</i> (2004)
Methyl Methansulfonat	Gentoxin	18	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		55,95	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		16,25	LOEC 16-20h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Cahill <i>et al.</i> (2004)
Natriumchlorid	Kochsalz	4870	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		11294	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		6200	EC ₂₀ 3h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		7050	EC ₂₀ 4h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Fluoreszenzhemmung	Diese Arbeit
		9675	LC ₅₀ 96h	<i>Lepomis macrochirus</i>	Fisch	Mortalität	Birge <i>et al.</i> (1985)
		7341	LC ₅₀ 96h	<i>Carassius auratus</i>	Fisch	Mortalität	Adelman & Smith (1976)
		13750	LC ₅₀ 24h	<i>Carassius auratus</i>	Fisch	Mortalität	Dowden <i>et al.</i> (1965)
		15500	NOEC 96h	<i>Gambusia affinis</i>	Fisch	Mortalität	Birge <i>et al.</i> (1985)
		17550	LC ₅₀ 96h	<i>Gambusia affinis</i>	Fisch	Mortalität	Wallen <i>et al.</i> (1957)
		21000	LC ₁₀₀ 96h	<i>Gambusia affinis</i>	Fisch	Mortalität	Wallen <i>et al.</i> (1957)
		14125	LC ₅₀ 24h	<i>Lepomis macrochirus</i>	Fisch	Mortalität	Dowden <i>et al.</i> (1965)
		12946	LC ₅₀ 96h	<i>Lepomis macrochirus</i>	Fisch	Mortalität	Patrick <i>et al.</i> (1968)
		7650	LC ₅₀ 96h	<i>Pimephales promelas</i>	Fisch	Mortalität	Adelman & Smith (1976)
		11540	LC ₅₀ 96h	<i>Gambusia holbrooki</i>	Fisch	Mortalität	Newman und Aplin (1992)
		18735	LC ₅₀ 25h	<i>Mollienesia latipinna</i>	Fisch	Mortalität	Dowden <i>et al.</i> (1965)
		13183	LC ₅₀ 24h	<i>Ictalurus punctatus</i>	Fisch	Mortalität	Reed und Davies (1981)
		14000	LC ₅₀ 24h	<i>Micropterus salmoides</i>	Fisch	Mortalität	Reed und Davies (1981)
		50000	LC ₁₀₀ 15min	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Fisch	Mortalität	Spehar <i>et al.</i> (1981)
		6175	EC ₅₀ 16h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Anderson (1944)
		3412	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Dowden <i>et al.</i> (1965)
		1000	EC ₅₀ 24h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Khengarot (1989)
		1000	EC ₅₀ 48h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Khengarot (1989)
		4135	EC ₅₀ 48h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Biesinger <i>et al.</i> (1972)
		<4200	EC ₅₀ 48h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Anderson (1946)
		3630	EC ₅₀ 64h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	EPA (1971)
		2422	EC ₅₀	<i>Daphnia pulex</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Birge <i>et al.</i> (1985)
		4200	EC ₅₀	<i>Physa gyrina</i>	Gastropoda	Immobilisation	Birge <i>et al.</i> (1985)
		11000	EC ₅₀ 48h	<i>Polycelis nigra</i>	Planarie, Strudelwurm		Jones (1941)
		8075	EC ₅₀	<i>Chironomus attenuatus</i>	Insekt		Thornton u. Sauer (1972)
		6250	EC ₅₀	<i>Cricotopus trifasciata</i>	Insekt		Hamilton <i>et al.</i> (1975)
		6656	EC ₅₀ 48h	<i>Hydroptila angusta</i>	Insekt		Hamilton <i>et al.</i> (1975)
		4860	EC ₅₀	<i>Lirceus fontinalis</i>	Isopoda		Birge <i>et al.</i> (1985)
		2430	EC ₅₀ 5d	<i>Nitzschia sp.</i>	Alge	Wachstumshemmung	Patrick <i>et al.</i> (1968)
		800	LC ₅₀ 8d	<i>Salmo gairdneri</i>	Fisch	Mortalität	Carmargo u. Tarazona (1991)
		11764	LC ₅₀ 10d	<i>Carassius auratus</i>	Fisch	Mortalität	Threder <i>et al.</i> (1983)
		32897	IC ₅₀ 5 min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		17265	IC ₅₀ 5 min	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		75363	IC ₅₀ 18 h	<i>Escherichia coli</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)

Substanz	Kurzbeschreibung	Wert in mg/l	Endpunkt/Dauer	Organismus	Beschreibung	Parameter	Referenz
		75363	IC ₅₀ 18 h	<i>Bacillus subtilis</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		2173	IC ₅₀ 24 h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		3525	IC ₅₀ 24 h	<i>Daphnia magna</i>	Kleinkrebs	Immobilisation	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		3691	IC ₅₀ 24 h	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Rädertier	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		161122	IC ₅₀ 24h	<i>Artemia salina</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		6873	IC ₅₀ 24h	<i>Streptocephalus prosocideus</i>	Kleinkrebs	Mortalität	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		1726	IC ₅₀ 18h	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Pflanze	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		3777	IC ₅₀ 72h	<i>Allium cepa</i>	Pflanze	Wachstumshemmung	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		26131	IC ₅₀ 5min	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		24387	IC ₅₀ 15min	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
		23832	IC ₅₀ 15min	<i>Vibrio fischeri</i>	Bakterium	Biolumineszenz	Clemedson <i>et al.</i> (1996)
4-Nitroquinolin-N-oxid	Gentoxin	0,0113	EC ₂₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		0,0324	EC ₅₀ 8h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Diese Arbeit
		~ 0,8	EC ₅₀	<i>Salmonella typhimurium</i>	Bakterium	Wachstumshemmung	Baun <i>et al.</i> (1999)
		0,00008	LOEC	<i>Chlostridium ehrenbergii</i>	Alge	Wachstumshemmung	Hamada <i>et al.</i> (1996)
		0,13	LOEC 16-20 h	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Wachstumshemmung	Cahill <i>et al.</i> (2004)

Anhang D – Glossar

Akuter Test	Vergleichende Untersuchung, in der der (mögliche) Effekt einer Behandlung auf den jeweiligen Testorganismus über eine kurze Periode hinweg überwacht wird. Der Untersuchungszeitraum macht dabei für gewöhnlich keinen substantiellen Teil der Lebensspanne (des Testorganismus) aus. Bei akuten Testverfahren wird häufig die Mortalität als Parameter verwendet. (ASTM, 2002).
Akutwirkung	Akutwirkung ist die Sofortwirkung, z. B. die Giftstoffwirkung im Organismus gleich nach der Aufnahme mit zum Teil heftigen Reaktionen.
Antagonistischer Effekt	Ein antagonistischer Effekt tritt auf, wenn eine Verbindung (oder eine Gruppe von Verbindungen) die Wirkung einer anderen Verbindung maskiert. In solchen Fällen ist die Gesamtwirkung zweier (oder einer Gruppe) zusammen wirkender Verbindungen <u>kleiner</u> als die Summe der entsprechenden Einzelwirkungen.
Antifoulingmittel	Antifoulingmittel sind chemische Stoffe, die Ablagerungen von Feststoffen auf Unterlagen verhindern. Verwendet werden u. a. Antifoulingfarben als Schiffbodenanstrich, die am Schiffsrumpf den tierischen und pflanzlichen Bewuchs verhindern. Sie enthalten u. a. neben Teer und Bitumen bestimmte Verbindungen, die für Algen, Pilze und Muscheln giftig sind.
Basenpaarung	Paarung der Basen A mit T oder G mit C in der DNA-Doppelhelix. Unter bestimmten Umständen können sich in RNA auch andere Paarungen ergeben.
Bioakkumulation	Bei der Bioakkumulation handelt es sich um die Nettoakkumulation einer Substanz durch einen Organismus aus allen umgebenden Quellen. (ASTM, 2002).
Biomonitoring	Die regelmäßige (z. B. monatliche oder quartalsweise) Beurteilung der Qualität von Wasser, Luft, Sediment oder des Bodens unter Verwendung lebender Organismen als Messsystem.
Biotests (syn. Bioassays)	Biotests dienen dem quantitativen oder qualitativen Nachweis von Schadstoffwirkungen unter definierten und standardisierten Bedingungen. Dabei werden Änderungen einer definierten biologischen Aktivität in lebenden Organismen, Geweben oder Zellen erfasst. Biotests ermöglichen die Erfassung integrierter toxischer Effekte.
bp	Abkürzung für Basenpaare; Einheit für DNA-Längenangaben.
CAS Nummer	Die Chemical Abstract Service (CAS) Nummer ermöglicht die eindeutige Identifizierung aller bekannten chemischen Substanzen, für die teilweise mehrere Namensgebungen existieren (Bsp.: Acetylsalicylsäure (ASS) wird auch als 2-Acetoxybenzoesäure bezeichnet). Die CAS Nummer wird durch den Chemical Abstract Service, einer Abteilung der Amerikanischen Chemischen Gesellschaft, vergeben. Diese Nummer wird weltweit verwendet. Die CAS Nummer besteht aus bis zu neun Ziffern, welche durch Bindestriche in drei Gruppen eingeteilt werden (xxxxxx-xx-x). Die Erste Gruppe besteht aus bis zu sechs Ziffern, die zweite Gruppe besteht aus zwei Ziffern. Die einzelne Ziffer der letzten Gruppe dient der Plausibilitätsprüfung.
Chronische Toxizität	Unerwünschter Effekt einer Substanz als Resultat einer wiederholten Exposition oder der Einwirkung über einen längeren Zeitraum hinweg (mind. 50 % der Lebensspanne). Bei Biotestverfahren zum Nachweis von chronischer Toxizität wird die Wirkung einer Substanz häufig über mehrere Generationen hinweg betrachtet.
Chronischer Test	Vergleichende Untersuchung, in der der (mögliche) Effekt einer Behandlung auf den jeweiligen Testorganismus über einen langen Zeitraum oder über einen wesentlichen Teil seiner Lebensspanne hinweg überwacht wird. Häufig verwendete Kriterien bei chronischen Testverfahren sind Wachstum und Reproduktion (ASTM, 2002).
Cycline	Proteine, die sich kontinuierlich während des Zellzyklus ansammeln und an bestimmten Stellen des Zyklus durch Proteolyse wieder abgebaut werden.
Deletion	Verlust eines DNA-Abschnittes, wobei sich die Enden der angrenzenden Bereiche miteinander verbinden.

Denaturierung	Übergang vom doppel- zum einzelsträngigen Zustand bei DNA und RNA. Strangtrennung kann z. B. durch Erhitzen erreicht werden. Bei Proteinen spricht man vom Übergang der biologisch aktiven in eine andere, inaktive Konformation.
DNA-Polymerase	Enzym, das einen DNA-Tochterstrang anhand einer DNA-Matrize synthetisiert und an DNA-Reparatur und -Replikation beteiligt sein kann.
DNase	Enzym, das Bindungen in DNA-Molekülen spaltet.
Dosis-Wirkungsbeziehung	Dosis-Wirkungsbeziehung ist die Abhängigkeit eines durch chemische oder physikalische Agenzien ausgelösten (therapeutischen oder toxischen) Effekts von der applizierten Dosis. Die Kenntnis der Dosis-Wirkungsbeziehungen stellt die Entscheidungsgrundlage für die Definition von Grenzwerten dar.
Einzelkopieplasmide	Plasmide, die in der Zelle stets mit einer Kopie pro Wirtschromosom vorliegen.
Einzelstrangbruch	Fehlen oder Spaltung einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei benachbarten Nucleotiden in einem Strang der DNA-Doppelhelix.
Endonucleasen	Enzyme, die Bindungen innerhalb einer Nucleotidkette spalten; sie können spezifisch für RNA oder für einzel- oder doppelsträngige DNA sein.
Erbgutschädigend	Erbgutschädigend sind Stoffe und Zubereitungen, wenn sie beim Einatmen, Verschlucken oder durch Aufnahme über die Haut vererbare genetische Schäden zur Folge haben oder deren Häufigkeit erhöhen können.
Eukaryoten (früher Eukaryonten)	Organismen mit Zellkern.
Excisionsreparatursysteme	Systeme, die einzelsträngige DNA-Abschnitte, welche beschädigte oder falsch gepaarte Basen enthalten, entfernen und den ausgeschnittenen Bereich im DNA-Doppelstrang ersetzen, indem eine zum verbleibenden Strang komplementäre Sequenz neu synthetisiert wird.
Exposition	Exposition ist die Gesamtheit der äußeren Bedingungen (Einflüsse, Gefahren), denen ein Organismus ausgesetzt ist und für die Entstehung einer Krankheit als Ursache gesehen werden können. Schädlingsbekämpfer sind zum Beispiel gegenüber Pestiziden exponiert.
Expression	siehe Genexpression
Falsch negativ	Das Testgut wird als nicht toxisch bewertet, obwohl es tatsächlich toxisch ist.
Falsch positiv	Das Testgut wird als toxisch eingestuft, obwohl es tatsächlich nicht toxisch ist.
Fortpflanzungsgefährdend	Fortpflanzungsgefährdend sind Stoffe und Zubereitungen, wenn sie beim Einatmen, Verschlucken oder durch Aufnahme über die Haut nichtvererbare Schäden der Nachkommen hervorrufen oder deren Häufigkeit erhöhen oder eine Beeinträchtigung der weiblichen oder männlichen Fortpflanzungsfunktionen beziehungsweise Fortpflanzungsfähigkeit zur Folge haben können.
Fruchtschädigend	Fruchtschädigend (embryotoxisch) ist die Schädigung der Leibesfrucht durch chemische Noxen (Giftstoffe), physikalische Einwirkungen (ionisierende Strahlen) und Infektionen.
G1-Phase	Zeitabschnitt im Zellzyklus der Eukaryoten, der zwischen dem Ende der Mitose und dem Beginn der DNA-Replikation liegt.
G2-Phase	Zeitabschnitt im Zellzyklus der Eukaryoten, der zwischen dem Ende der DNA-Replikation und dem Beginn der nächsten Mitose liegt.
Gefährdungspotenzial	Das Gefährdungspotenzial von Chemikalien für Mensch und Umwelt ist im wesentlichen eine Funktion der Stofftoxizität und der Exposition. Es wird durch eine Reihe von Stoff- und Systemeigenschaften bestimmt. Von maßgeblicher Bedeutung sind Mengen- und Wirkparameter der Stoffe.
Gen (Cistron)	DNA-Abschnitt, der eine Polypeptidkette codiert.
Genexpression	Umsetzung der Information eines Gens durch Transkription und Translation.
Genom	Gesamtgenbestand einer Zelle.
Genotyp	Genetische Konstitution eines Organismus.

Gesundheitsschädlich	Gesundheitsschädlich (früher mindergiftig) ist ein Einstufungsbegriff der Toxizität (Giftigkeit) von chemischen Stoffen entsprechend den Festlegungen der Gefahrstoffverordnung. Gesundheitsschädlich sind Stoffe und Zubereitungen, wenn sie bei Einatmung, Verschlucken oder Aufnahme über die Haut zum Tode führen oder akute und chronische Gesundheitsschäden verursachen können.
Gifte	Gifte sind Stoffe (Naturstoffe, Chemikalien, Arzneistoffe etc.), die in relativ kleinen Mengen, zum Teil erst nach Umwandlung im Organismus (Giftung), durch ihre chemischen oder physikalischen Eigenschaften Funktionsstörungen, Gesundheitsschäden oder den Tod hervorrufen können.
Gifteinteilung	Gifteinteilung erfolgt nach Festlegungen in der Gefahrstoffverordnung für Stoffe (zum Beispiel Pestizide) entsprechend ihrer mittleren letalen oralen Dosis (LD50 oral, Ratte). Sehr giftig ≤ 25 mg/kg Körpermasse giftig $>25-200$ mg/kg Körpermasse, gesundheitsschädlich $\geq 200-2000$ mg/kg Körpermasse und >2000 mg/kg Körpermasse keine Einteilung als Gift.
Giftig	Giftig ist ein Einteilungsbegriff der Toxizität, festgelegt in der GefStoffV mit LD50 _{oral} , Ratte 25 bis 200 mg/kg Körpergewicht. Giftig sind Stoffe und Zubereitungen, wenn sie in geringer Menge beim Einatmen Verschlucken oder Aufnahme über die Haut zum Tode führen oder akute oder chronische Gesundheitsschäden verursachen können.
Giftwirkung	Giftwirkung tritt in vielen typischen Fällen zunächst an einzelnen Organsystemen auf. Dabei ist die Wirkung abhängig von Menge, Konzentration, Löslichkeit, Verabfolgung beziehungsweise Ort der Einwirkung und deren Dauer, Resorbierbarkeit, Verteilung im Organismus und von der individuellen Konstitution.
Grenzwerte	Grenzwerte stellen die Grenzen der Belastbarkeit dar. Es ist der Bereich, wo Gesundheitsschädigungen zu erwarten oder nicht mehr auszuschließen sind. Ein absoluter Schutz zum Beispiel gegenüber Gefahrstoffen ist nur durch die Beseitigung der Belastung zu erreichen. Der Beginn der Gesundheitsschädigung ist oft nicht eindeutig festzulegen, da die tatsächliche Belastung von vielen Faktoren abhängig ist. Grenzwerte sind für äußere und innere Belastungen festgelegt, deren regelmäßige Überwachung notwendig ist.
Haushaltsgene (konstitutive Gene)	Haushaltsgene codieren grundlegende Funktionen, die in allen Zellen eines Organismus benötigt werden. Sie werden ständig in jeder einzelnen Zelle exprimiert, unabhängig von der Funktion der Zelle. Haushaltsgene werden ohne weitere Regulation allein aufgrund der Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und Promotor exprimiert.
Hemmtest	Ein Hemmtest besteht aus mehreren Testansätzen und mindestens einer Kontrolle. Das gemessene Testkriterium ist entweder ein Parameter der Stoffwechselrate oder des Wachstums. Die Messwerte aus verschiedenen Konzentrationen werden als Prozentwert relativ zur Kontrolle ausgedrückt. Für die Angabe der Daten kann gewählt werden, ob entweder %Hemmung oder %vom Kontrollwert gewählt wird. Die Auswertung erfolgt nach dem Verfahren der Probitanalyse. Die Vertrauensbereiche für die EC-Werte werden nach den Vorschriften für metrische Daten berechnet.
Hochgiftige Stoffe	Hochgiftige Stoffe = sehr giftige Stoffe mit einer LD50 _{oral} , Ratte <25 mg/kg Körpermasse.
Holzschutz	Holzschutz beinhaltet Maßnahmen zum Schutz des Holzes vor der zerstörerischen Wirkung verschiedener Holzschädlinge (Bakterien, Pilze, Insekten). Im konstruktiven Holzbau ist der Holzschutz gesetzlich vorgeschrieben.
Hybridisierung	Basenpaarung zwischen komplementären DNA- oder RNA-Strängen.
Hydrolyse, hydrolytische Spaltung	Chemische Reaktion, bei der eine kovalente Bindung unter Wasseranlagerung gespalten wird.
Hydrophil	Bezeichnung für chemische Gruppen, die mit Wasser interagieren, so dass hydrophile Proteinbereiche oder die hydrophilen Außenseiten der Lipiddoppelschicht in einer wässrigen Umgebung liegen.
Hydrophob	Bezeichnung für chemische Gruppen, die Wasser abstoßen und untereinander in Wechselwirkung treten, so dass ein nichtwässriges Milieu entsteht.
Insertion	Einbau neuer Basenpaare in die DNA.
Interphase	Zeitraum zwischen den Zellteilungen der Mitose, die man in G1, S und G2 unterteilt.
Intoxikation	Intoxikation bedeutet Vergiftung, das heißt, die schädliche Einwirkung pflanzlicher, tierischer, bakterieller, chemischer oder sonstiger Gifte auf den Organismus und das darauf beruhende Krankheitsbild.

kb (Kilobase)	Abkürzung für 1000 bp DNA oder 1000 Basen einer RNA.
Klon	Große Zahl von Zellen, die mit einer gemeinsamen Vorläuferzelle identisch sind.
Kohäsive Enden (<i>sticky ends</i>)	Komplementäre DNA-Einzelstränge, die durch versetzte Schnitte in DNA-Doppelsträngen erzeugt werden und an den entgegengesetzten Enden eines oder zweier Doppelstränge herausragen.
Komplementär	Bezeichnung für Nucleotide oder Nucleotidsequenzen, die Basenpaare miteinander bilden können.
Konsensussequenz	Idealisierte Sequenz, in der jede Base derjenigen entspricht, die man in verschiedenen realen Sequenzen am häufigsten findet.
konstitutive Gene	siehe Haushaltsgene.
Krebserzeugend	Krebserzeugend (kanzerogen) sind Substanzen oder Faktoren, die beim Menschen oder im Tierversuch die Anzahl der Neuerkrankungsfälle (Inzidenz) bösartiger (maligner) auch spontan auftretender Tumoren erhöhen, die die Latenzzeit der Karzinogenese verkürzen oder das Tumorspektrum in einem Gewebe verändern können, wirken direkt oder indirekt vor allem diejenigen, die mutagen in charakteristischen Geweben wirksam werden.
LC₅₀	LC ₅₀ ist die mittlere letale Konzentration bei der 50 Prozent (die Hälfte) der Versuchstiere nach inhalativer Aufnahme (Einatmung des Schadstoffes) sterben.
LD₅₀	LD ₅₀ ist die mittlere letale Dosis bei der 50 Prozent (die Hälfte) aller Versuchstiere nach orale oder dermale Aufnahme sterben. Sie ist die Grundlage für die Festlegung der Toxizität
Leseraster	Eine von drei Möglichkeiten, eine Nucleotidsequenz als Abfolge von Triplets zu lesen.
Leserasterverschiebung	Mutation durch Deletion oder Insertion, deren Länge kein Vielfaches von 3 bp ist und die dadurch das Leseraster bei der Translation der Triplets in das Protein verändert.
Ligase	(<i>Lat. ligare = verbinden, vereinigen</i>) Enzym, das zwei Moleküle in einem energieabhängigen Prozess miteinander verbindet. Die DNA-Ligase verbindet zwei DNA-Moleküle über eine Phosphodiester-Bindung miteinander.
Ligation	Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei Basen, die durch einen Einzelstrangbruch in einem Strang der DNA-Doppelhelix getrennt sind. Der Begriff wird auch auf die Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden angewandt.
Lindan	Lindan ist chemisch ein chlorierter Kohlenwasserstoff. Aufgrund seiner Toxizität (LD50 _{oral} , Ratte = 88 mg/kg) gilt es als giftig. Die Lindan-Präparate (Pflanzenspray Hortex, Insektenil-flüssig-V, Insektenil-flüssigforte-S) werden als Insektizide appliziert. Bei Vergiftungen durch Lindan treten Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Schwindel, Schlaflosigkeit und bei schweren Vergiftungen Krämpfe auf.
Luftverschmutzung	Luftverschmutzung ist die emissionsbedingte Verunreinigung der Atemluft besonders durch molekular-disperse Gase, kolloid-disperse Aerosole und grobdisperse Stäube. Gesundheitsgefährdung besteht durch luftverunreinigende Stoffe wie Kohlenmonoxid, Schwefeldioxid, Metallstäube, aber auch durch Pestizidrückstände in Räumen.
Mb (Megabase)	Abkürzung für 10 ⁶ bp DNA.
Mehrfachkopieplasmide	Plasmide, die in einer Zelle in mehr als einer Kopie pro Chromosom vorliegen.
Metallothioneine	Bei Metallothioneinen handelt es sich um eine Gruppe von Cystein reichen, niedermolekularen Proteinen (6000-7000 D), die Schwermetalle binden und so dem Schutz vor deren toxischen Eigenschaften dienen.
Mindergiftig	Mindergiftig ist die frühere Bezeichnung für gesundheitsschädlich nach den Festlegungen der Gefahrstoffverordnung für den Toxizitätsbereich LD50 oral, Ratte zwischen 200 und 2.000 mg/kg Körpermasse. (siehe auch gesundheitsschädlich).
Mutagene	Wirkstoffe, die durch DNA-Veränderungen die Mutationshäufigkeit erhöhen.
Mutation	Stabile, vererbliche Veränderung der Nucleotidsequenz eines Chromosoms.
NOEC	Die Abkürzung steht für <i>no-observed-effect-concentration</i> . Dabei handelt es sich um die höchste Konzentration des Testgutes im Test, die noch keinen nachweisbaren negativen Effekt auf den Testorganismus ausübt (kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Probe und Negativkontrolle) (EPA, 2000).

Palindrom	DNA-Sequenz, die von links nach rechts und von rechts nach links gelesen gleich ist und aus benachbarten umgekehrten Wiederholungssequenzen besteht.
Phänotyp	Äußere Erscheinungsform eines Organismus, wie sie durch die Wechselwirkung zwischen seiner genetischen Konstitution (Genotyp) und seiner Umwelt entsteht.
Plasmamembran	Geschlossene Membranhülle, von der alle Zellen umgeben sind.
Plasmid	Autonomes, selbstreplizierendes, extrachromosomales ringförmiges DNA-Molekül.
Primer	Kurze Nucleotidsequenz, die sich mit einem Strang der DNA paart und ein freies 3'-OH-Ende besitzt, an dem die DNA-Polymerase mit der Synthese einer Desoxyribonucleotidkette beginnen kann.
Prokaryoten (früher Prokaryonten)	Organismen ohne Zellkern (Bakterien und Archaeobakterien).
Promotor	DNA-Region, die an der Bindung der RNA-Polymerase beteiligt ist, um die Transkription zu starten.
Proteolyse, proteolytisch	Bezeichnung für Reaktion, bei denen Peptidbindungen eines Proteins hydrolysiert werden.
Punktmutation	Veränderung in der DNA, die ein einzelnes Basenpaar betrifft.
Referenzsubstanz (Positivkontrolle)	Eine Verbindung, die bei der Durchführung von Biotests dazu dient, die Sensitivität des Testsystems und die vorschriftsmäßige Durchführung des Verfahrens zu belegen und um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. (NELAC, 2001).
Rekombinationsreparatur	Methode zum Schließen einer Lücke in einem Strang der DNA-Doppelhelix durch Übernahme eines homologen Einzelstranges aus einem anderen Doppelstrang.
Rekombinationsstelle	Verbindungsstelle zweier rekombinierender DNA-Doppelstränge (Ende der Heteroduplexregion).
Replikat	Jeder einzelne von mehreren Versuchsansätzen, die gleichzeitig unter identischen experimentellen Bedingungen untersucht werden (ASTM, 2002).
Replikationsursprung (<i>origin</i>, <i>ori</i>)	DNA-Sequenz, an der die Replikation beginnt.
Reportergen	Codierende Einheit mit leicht nachweisbarem Genprodukt, die mit jedem zu untersuchenden Promotor verbunden werden kann, so dass man anhand ihrer Expression Aufschlüsse über die Promotorfunktion gewinnen kann.
Reporterorganismen	Reporterorganismen sind rekombinante Organismen, bei denen durch gentechnische Manipulation so genannte Reportergene (z. B. GFP, s. o.) hinter den Promotorsequenzen induzierbarer Gene angeordnet sind. Durch die Quantifizierung des Reporter-genproduktes kann auf die Aktivität des entsprechenden Promotors zurück geschlossen werden. Reporterorganismen ermöglichen die Erkennung komplexer physiologischer Zusammenhänge.
Restriktionsenzyme	Enzyme, die kurze Sequenzen in (meist) unmethylierter DNA erkennen und den Doppelstrang an dieser Erkennungsstelle oder ein Stück davon entfernt schneiden.
Schwermetalle	Als Schwermetalle werden die Metalle des Periodensystems bezeichnet, die ein spezifisches Gewicht von mehr als 4.5 g/cm ³ aufweisen. Die im allgemeinen Sprachgebrauch oftmals fälschlicherweise als Schwermetalle bezeichneten Elemente Arsen (Übergangsmetall) und Aluminium (Leichtmetall) sind dies definitionsgemäß nicht.
Shuttle-Vektor	Plasmid mit Replikationsstartpunkten für zwei Wirtszellen (beispielsweise für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>), so dass sich eine Fremdsequenz sowohl in Pro- als auch in Eukaryotenzellen vermehren lässt.
Stichprobe, qualifiziert	Die qualifizierte Stichprobe ist nach der nationalen Vorschrift für die „Probenahme von Abwasser“ (DIN 38402-11) eine Sammelprobe aus mindestens fünf Stichproben, die im Abstand von nicht weniger als 2 min und über eine Zeitspanne von höchstens 2 h entnommen werden.
Synergistischer Effekt	Ist die Gesamtwirkung zweier (oder einer Gruppe) zusammen wirkender Verbindungen größer als die Summe der entsprechenden Einzelwirkungen, spricht man von einem synergistischen Effekt.
Teratogenität	Teratogenität steht für die Fähigkeit gewisser chemischer Substanzen oder physikalischer Einflüsse (z. B. radioaktive Strahlung), Embryonen während der ersten drei Schwangerschaftsmonate zu schädigen, bis Missbildungen oder Todesfälle verursacht werden.

Toxizität	<p>Der Begriff <i>Toxizität</i> findet auf zweierlei Weise Verwendung. (i) Als die Eigenschaft einer Chemikalie, einen Schaden in einem Organismus hervorzurufen. (ii) Jeder nachteilige Effekt einer Substanz auf den lebenden Organismus. Der Grad der Toxizität jeder Substanz ist direkt proportional zur applizierten Konzentration und zu der Dauer der Exponierung.</p> <p>Die toxische Wirkung eines Stoffes wird durch folgende Kriterien bestimmt: akute Giftigkeit (z. B. bezogen auf den Menschen, Landsäugetiere), akute Fischgiftigkeit, krebserzeugende Eigenschaften, erbgutverändernde Eigenschaften, Fruchtbarkeitsmindernde Eigenschaften, fruchtschädigende Eigenschaften, Abbaubarkeit bzw. Nicht-Abbaubarkeit (Persistenz) und Anreicherungsfähigkeit in Lebewesen (Bioakkumulationsfähigkeit).</p>
Umweltrelevanz	<p>Wichtigkeit eines Faktors und seiner Auswirkung aus Sicht der Umweltqualität.</p>
Vertrauensintervall	<p>Vertrauensintervalle geben auf den zu Grunde liegenden Daten und statistischen Modellen beruhende Wahrscheinlichkeitsbereiche an, innerhalb derer der <i>wahre Wert</i> mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit liegt. Für gewöhnlich werden Vertrauensintervalle mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % oder (seltener) 99 % angegeben.</p>
Zellzyklus	<p>Zeitraum zwischen zwei (mitotischen) Zellteilungen.</p>

Bestimmung des cytotoxischen Potenzials von Wasserinhalstoffen unter Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae*

0 Allgemeines

Die vorliegende Arbeitsvorschrift beschreibt eine Teststrategie zum Nachweis und zur Bewertung cytotoxischer Effekte in wässrigen Lösungen. Als biologische Komponente verwendet dieses Verfahren die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, einen eukaryotischen Organismus. Aufgrund des zellulären Aufbaus mit Organellen, Chromosomenstruktur, DNS-Reparaturmechanismen und metabolischen Prozessen, die insgesamt denen höherer Eukaryonten bis hin zu den Säugetieren stark ähneln, ist die Hefe ein vielseitiger und daher häufig verwendeter Modellorganismus. Die Verwendung dieses Organismus verbindet die Vorzüge eukaryotischer Testsysteme mit den Vorteilen prokaryotischer Verfahren hinsichtlich der kurzen Inkubationszeit, gut reproduzierbarer Wachstumsraten und einfacher Datenerhebung. Der auf *S. cerevisiae* basierende Test bietet ein robustes Verfahren mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

1 Anwendungsbereich

Das Verfahren kann zum Nachweis substanz- bzw. probenassoziierter cytotoxischer Effekte in einem Testzeitraum von 8 h eingesetzt werden. Die Methode ist auf Wasser, Abwasser und auf chemische Monosubstanzen anwendbar, die unter den testspezifischen Bedingungen löslich sind. Für Monosubstanzen werden die erzielten Ergebnisse in international anerkannten Einheiten (z. B. mg/l) als die effective concentration (EC) angegeben, die eine Wachstumshemmung von 20 % (EC_{20} -Wert) bzw. 50 % (EC_{50} -Wert) verursacht. Bei komplexen Proben wird die kleinste Verdünnungsstufe (G-Wert) in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe angegeben, bei der die Wachstumshemmung einen Wert von 20 % nicht mehr erreicht.

1.1 Toxikologischer Endpunkt

Das Nachweisverfahren basiert auf dem veränderten Wachstum des Testorganismus unter Einfluss toxischer Verbindungen bzw. toxischer Proben. Als Maß für das Wachstum wird die Trübung verwendet. Die Trübung wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Die Ergebnisse werden bei Monosubstanzen als Konzentrations-Wirkungs-Diagramme dargestellt. Bei komplexen Proben wird die Verdünnungsstufe gegen die resultierende Wachstumshemmung aufgetragen. Die angegebenen EC-Werte werden durch interpolierte Regressionsanalyse ermittelt.

2 Definitionen

Für die Verwendung dieser Vorschrift gelten die folgenden Definitionen.

2.1 Zellvermehrung

Zunahme der Zellzahl während der Versuchszeit.

2.2 Stammkultur

Kultur zur Bewahrung des ursprünglichen Teststammes im Laboratorium und zur Bereitstellung des Impfmateri als für die Stammkultur. Die Stammkultur wird bei -80 °C gelagert. Die Lagerungszeit sollte 1 Jahr nicht überschreiten. Überalterte Kulturen sind durch neue, bezüglich ihres Genotyps überprüfte Stammkulturen zu ersetzen.

2.3 Stammkultur

Kultur zur Bereitstellung des Impfmateri als für die Übernacht-Kultur.

2.4 Übernacht-Kultur

Kultur zur Vermehrung der Hefe für die Vorkultur.

2.5 Vorkultur

Hefekultur zur Bereitstellung des Inokulums für Test-, Negativkontroll- sowie Positivkontrollansatz.

2.6 Inokulum

Impfmateriel zur Herstellung von Test-, Negativkontroll- und Positivkontrollansatz.

2.7 Nährmedium

Wässrige Lösung von Nähr-, Vitamin und Mineralstoffen, die für das Wachstum der Hefe notwendig sind.

2.8 Testgut

Die zu untersuchende gelöste Substanz bzw. Probe. Dabei beinhaltet eine Probe das Material jeweils nach Abschluss aller Vorbereitungsmaßnahmen, wie Zentrifugation und pH-Wert-Einstellung.

2.9 Verdünnungsansatz

Mischung aus Testgut und Verdünnungswasser/Lösemittel in verschiedenen Volumenverhältnissen.

2.10 Testansatz

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und Verdünnungsansatz.

2.11 Negativkontrollansatz, Negativkontrolle

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und ggf. Lösemittel.

2.12 Positivkontrollansatz, Positivkontrolle

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und in Lösemittel gelöstem, gut untersuchtem wachstumshemmenden Stoff, z. B. 4 Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO) und ggf. Lösemittel.

2.13 Leerwertkontrolle für Testansatz

Mischung aus Nährmedium und Verdünnungsansatz.

2.14 Leerwertkontrolle für Negativkontrollansatz

Nährmedium und ggf. Lösemittel in der in den Testansätzen verwendeten Menge.

2.15 Leerwertkontrolle für Positivkontrollansatz

Mischung aus Nährmedium und in Lösemittel gelöstem, gut untersuchten wachstumshemmenden Stoff, z. B. 4-Nitroquinolin-*N*-oxid (4-NQO) und ggf. Lösemittel.

2.16 Verdünnungsstufe G

Das Volumenverhältnis einer Mischung der (Ab-)Wasserprobe mit Verdünnungswasser im Testansatz nach Zugabe von Inokulum und Nährmedium. Die testbedingt kleinstmögliche Verdünnung (Probe ohne Zusatz von Verdünnungswasser) ist 1:0,25 (Probe : Nährmedium [fünffach konzentriert] plus Inokulum). Diese Verdünnungsstufe wird als $G = 1,25$ bezeichnet. Üblicherweise werden zunächst die Verdünnungsstufen 1.25, 2, 3, 4, 6, 8, 12 und 16 hergestellt.

2.17 Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Zunahme der Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der Konzentration des Testguts.

2.18 Testorganismus

S. cerevisiae ist ein einzelliger, eukaryotischer Organismus. Er gehört zum Reich der Pilze.

2.19 Indikatorstamm

Gentechnisch veränderter *S. cerevisiae* Stamm. Gegenüber bestimmten Substanzklassen sensitivierter Stamm zum Nachweis cytotoxischer Eigenschaften einer Substanz oder Probe.

2.20 Kontrollstamm

Entfällt

3 Grundlage des Verfahrens

Aus dem Vergleich der erreichten Trübungswerte im Negativkontrollansatz mit den erreichten Trübungswerten unter Einfluss des Testgutes ergibt sich ein Maß für die Cytotoxizität bzw. die wachstumshemmende Wirkung des untersuchten Materials nach einer definierten Einwirkzeit.

4 Störungen

Ungelöste Stoffe können das Testergebnis verfälschen und/oder die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen. Bei stark gefärbten Proben oder gefärbtem bzw. trübem Abwasser können bei der photometrischen Messung Lichtverluste durch Absorption auftreten. Derartige Effekte sind mit Hilfe der entsprechenden Leerwertkontrollen (2.13) zu überwachen.

5 Verwendete Stämme

Stamm	Plasmid	Relevanter Genotyp
<i>Ausgangsstamm</i> SCBH3TD		<i>MATa, his3D200, leu2-3, 112 trp1D901, ura3-52, suc2D9, pdr5::lox, snq2::lox, yor1::lox</i>
<i>Indikatorstamm</i> HLYRGI	pYEX-RAD54/GFP	wie SCBH3TD mit <i>RAD54/GFP, URA 3, LEU 2</i>

6 Geräte

- Schüttleinrichtung für Mikrottestplatten (850-950 rpm)
- Schüttleinrichtung für Übernacht-Kulturen (250 rpm)
- pH-Messgerät
- Dampfsterilisator
- Pipetten
- Küvetten
- Photometer
- Kulturgefäße, bevorzugt Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 50 ml
- Mikrottestplatten mit transparentem Boden und mit Deckel, z. B. Greiner CELLSTAR #655185
- Lesegerät für Mikrottestplatten
- Klimakammer mit einer Inkubationstemperatur von 28 °C
- Petrischalen
- Waage
- Zahnstocher, dampfsterilisiert
- 50 ml Schraubdeckelgefäße
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Zentrifugen mit Rotoreinsätzen für 1,5 ml Reaktionsgefäße und für 50 ml Schraubdeckelgefäße
- Messkolben
- Röhreinrichtungen

7 Medien und Reagenzien

Als Reagenzien werden, soweit möglich, stets solche des Reinheitsgrades *zur Analyse* verwendet. Sämtliche Lösungen werden mit bidestilliertem Wasser oder Wasser gleichen Reinheitsgrades hergestellt.

7.1 Reagenzien

Die Angabe der verwendeten Reagenzien erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

- Agar, Agar-Agar, CAS [9002-18-0], Verfestigung des Nährmediums für Stammkulturen.
- Aminosäure *Drop-Out*-Mischung, Vorratsmenge.

Aminosäure	CAS-Nummer	Einwaage*
Adenin	73-24-5	250 mg
Arginin	74-79-3	100 mg
Asparagin	70-47-3	100 mg
Glutaminsäure	56-86-0	100 mg
Lysin	56-87-1	150 mg
Methionin	63-68-3	100 mg
Phenylalanin	63-91-2	250 mg
Serin	56-45-1	500 mg
Threonin	72-19-5	500 mg
Tryptophan	73-22-3	500 mg
Tyrosin	60-18-4	150 mg
Valin	72-18-4	300 mg

* oder ein Vielfaches

- DMSO, Dimethylsulfoxid, CAS [67-68-5], häufig verwendetes Lösemittel. Da DMSO über toxische Eigenschaften verfügt, ist bei Verwendung unbedingt darauf zu achten, dass die Konzentration in den Testansätzen 2 % (v/v) nicht übersteigt.
- Glucose-Stocklösung, dampfsterilisierte wässrige Lösung aus D-Glucose, CAS [50-99-7], 40%ig (m/v).
- Natriumhydroxid-Lösung, CAS [1310-73-2], $c(\text{NaOH}) = 5 \text{ mol l}^{-1}$
ANMERKUNG: Zur Einstellung des pH-Wertes können gegebenenfalls auch schwächer konzentrierte Lösungen verwendet werden.
- 4-Nitroquinolin-1-oxid, CAS [56-57-5], Referenzsubstanz.
- Salzsäure, CAS [7647-01-0], $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol l}^{-1}$
- Supplement-Stocklösung, sterilfiltrierte Lösung aus L-Leucin, CAS [61-90-5], und L-Histidin, CAS [71-00-1] mit einer Konzentration von 4 mg ml^{-1} bzw. 2 mg ml^{-1} .
- YNB (Yeast Nitrogen Base) Medium, ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, Difco Ref. 233520.
- Zitronensäure Monohydrat, CAS [5949-29-1], Puffer zur Beibehaltung des eingestellten pH-Wertes

7.2 Medium für Stamm-, Übernacht- und Vorkulturen (einfach konzentriert)

YNB (<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase) Medium	$1,7 \text{ g l}^{-1}$
Aminosäure <i>Drop-Out</i> -Mischung	$0,5 \text{ g l}^{-1}$
Zitronensäure Monohydrat	$10,5 \text{ g l}^{-1}$ (final: 50 mM)
A. bidest	Ad 1000 ml
Agar (nur für Stammkultur)	20 g l^{-1}

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung je nach Fragestellung auf 4,75 bzw. 6,4 eingestellt. Nach der Dampfsterilisation (120°C, 20 min) werden der Lösung unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen 12,5 ml der 40%igen Glucose-Stocklösung (Finalkonzentration: 0,5 % [m/v]) zugegeben. Abschließend werden dem Nährmedium 10 ml der Supplement-Stocklösung zugegeben.

7.3 Medium für Vorkulturen bei Testung komplexer Proben (fünffach konzentriert)

Zur Erhöhung des Probenvolumens in den Ansätzen kann ein fünffach konzentriertes Nährmedium verwendet werden. Die Verwendung des konzentrierten Mediums ist bei komplexen Proben unerlässlich, kann aber auch bei Monosubstanzen nötig werden.

YNB (Yeast Nitrogen Base) Medium	8,5 g l ⁻¹
Aminosäure Drop-Out-Mischung	2,5 g l ⁻¹
Zitronensäure Monohydrat	52,5 g l ⁻¹ (final: 250 mM)
A. bidest	Ad 1000 ml

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung je nach Fragestellung auf 4,75 bzw. 6,4 eingestellt. Nach der Dampfsterilisation (120°C, 20 min) werden der Lösung unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen 62,5 ml der 40%igen Glucose-Stocklösung (Finalkonzentration: 2,5 % [m/v]) zugegeben. Abschließend werden dem Nährmedium 50 ml der Supplement-Stocklösung zugegeben.

8 Durchführung

Einen Tag vor Beginn des Tests mit der Anzucht des Impfmateri als (Übernacht-Kulturen) beginnen.

8.1 Herstellen der verschiedenen Kulturen

8.1.1 Herstellen der Stammkultur

Wichtig: Die Stammkultur unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen herstellen und inkubieren!

- Vorsichtiges Auftauen der Stammkultur auf Eis
- Entnahme von 100 µl der aufgetauten Zellsuspension.
- Ausstreichen der Zellsuspension auf festem Nährmedium.
- Inkubation der beimpften Petrischalen für etwa 2 Tage bei 28 °C, bis sich ein dichter Zellrasen gebildet hat.
- Die Verwendung der so hergestellten Stammkultur ist für den Zeitraum von (maximal) einem Monat zulässig.

8.1.2 Ansatz der Übernacht-Kultur

Wichtig: Die Übernacht-Kultur unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen herstellen und inkubieren!

- Sterilen Erlenmeyerkolben mit etwa 10 ml Nährmedium (siehe 7.2) befüllen.
- Animpfen der Übernacht-Kulturen. Dazu wird mit Hilfe eines Zahnstochers Zellmaterial von den Stammkulturen entnommen und in das vorgelegte Medium überführt.
- Kolben mit luftdurchlässigem sterilem Stopfen verschließen.
- Über Nacht auf einem Schüttler (250 rpm) in der Klimakammer bei 28 °C inkubieren.

8.1.3 Ansatz der Vorkultur

Wichtig: Die Vorkultur unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen herstellen!

- Teilmenge aus der Übernacht-Kultur entnehmen und in 50 ml Schraubdeckelgefäß überführen.
- Zentrifugation der entnommenen Teilmenge bei 1725 x g.
- Restlose Entfernung des Überstandes (verbrauchtes Nährmedium) mit Hilfe geeigneter Pipetten. NICHT abschütten, da durch den entstehenden Rücklauf eine vollständige Entfernung des verbrauchten Mediums auf diese Weise nicht möglich ist.
- Aufnahme des Zellmaterials in geeigneter Menge des frischen Nährmediums (je nach Anwendung nach 7.2 bzw. 7.3) bis eine Trübung von OD₆₀₀ = 0,1 (für Monosubstanzen) bzw. OD₆₀₀ = 0,5 (für komplexe Proben) eingestellt ist.

8.2 Probenvorbereitung

8.2.1 Probenvorbereitung bei Testung von Monosubstanzen

Herstellung der Verdünnungsansätze als Mischung aus gelöster Reinsubstanz und Verdünnungswasser/Lösemittel in verschiedenen Volumenverhältnissen.

8.2.2 Probenvorbereitung bei Abwasserproben

- Schonendes Auftauen von gefrorenen Proben in einem Wasserbad bei einer Temperatur um 30 °C .
- Durchmischung durch vorsichtiges, mehrmaliges Invertieren des Probengefäßes.
- Entnahme der zu bearbeitenden Teilmenge.
- Einstellen des pH-Wertes, je nach Fragestellung, auf 4,75 bzw. 6,4 mit Hilfe der Natriumhydroxid-Lösung bzw. der Salzsäure. Dabei die Konzentration der Säure bzw. Lauge so wählen, dass das zugegebene Volumen möglichst klein ist.
- Sollen enthaltene Schwebstoffe entfernt werden, wird die Probe bei 4000 x g in 50 ml Schraubdeckelgefäßen zentrifugiert.
- Herstellung der in 2.16 aufgeführten Verdünnungsreihe.

Für die spätere Verdünnungsstufe 1,25 wird die Probe unverdünnt eingesetzt. Für die spätere Verdünnungsstufe 2 wird zunächst eine Mischung aus Probe und Verdünnungswasser im Verhältnis 5:3 hergestellt. Durch 1:2 Verdünnungen dieser Mischung werden die späteren Verdünnungsstufen 4, 8 und 16 hergestellt. Für die spätere Verdünnungsstufe 3 wird zunächst eine Mischung aus Probe und Verdünnungswasser im Verhältnis 67:93 hergestellt. Durch 1:2 Verdünnungen dieser Mischung werden die späteren Verdünnungsstufen 6 und 12 hergestellt.

8.2.3 Vorbereitung der Referenzsubstanz für die Positivkontrollansätze

5 mg 4 Nitroquinolin-N-oxid in 5 ml DMSO lösen (kann portioniert bei -20 °C gelagert werden) und auf 500 µg/l mit einem DMSO-Wasser-Gemisch (3+7 Volumenanteile) einstellen. Weitere Verdünnungen mit Wasser sind möglich.

8.3 Belegung der Mikrotestplatten

Die Mikrotestplatten werden nach dem in Abbildung 1 dargestellten Pipettierschema belegt. Das Pipettierschema ist so gewählt, dass eine Beeinflussung der Testergebnisse durch die (geringen) Randeffekte minimiert wird. Jedes Experiment besteht aus einem Negativkontrollansatz und 4 Testkonzentrationen bzw. Verdünnungsstufen.

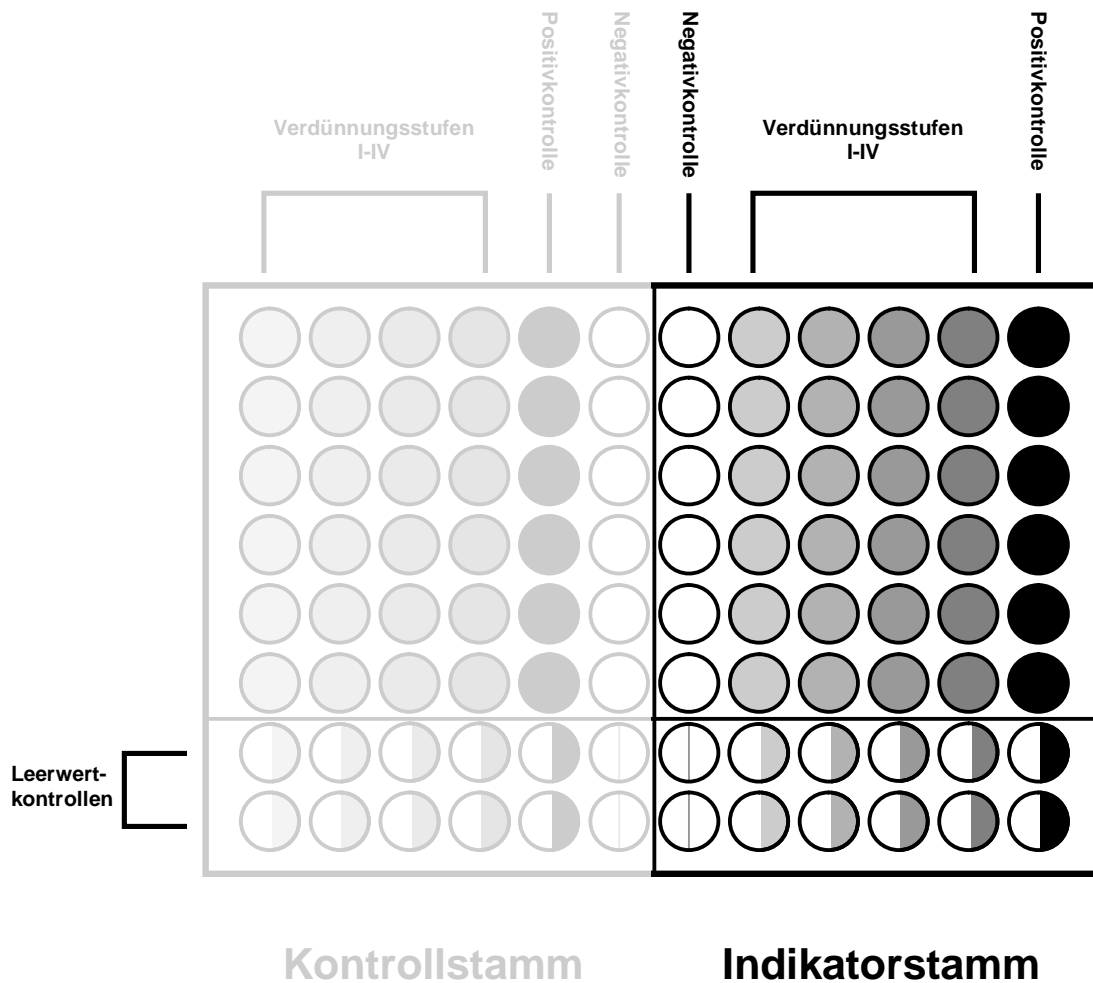


Abb. 1: Empfohlene Belegung der Mikrotestplatten. Aufgrund der gleichzeitigen Analyse von cyto- und gentoxischen Effekten, ist in der Abbildung die Verwendung eines Kontrollstammes angegeben. Dieser spielt jedoch ausschließlich zur Ermittlung gentoxischer Potenziale eine Rolle. Daher ist dieser Bereich der Plattenbelegung ausgeblendet.

8.3.1 Zusammensetzung der Test- und Kontrollansätze in Anteilen bei Testung von Monosubstanzen

	Volumen in µl					Gesamt
	Verdünnungs- ansatz	Vorkultur (Nährmedium + Inokulum)	Nährmedium OHNE Inoku- lum	Verdünnungs- wasser/ Lösemittel	Referenz- substanz	
Testansatz	20	180	-	-	-	200
Negativkontrollansatz	-	180	-	20	-	200
Positivkontrollansatz	-	180	-	-	20	200
Leerwertkontrollansatz für Testansatz	20	-	180	-	-	200
Leerwertkontrollansatz für Negativkontrollansatz	-	-	180	20	-	200
Leerwertkontrollansatz für Positivkontrollansatz	-	-	180	-	20	200

8.3.2 Zusammensetzung der Test- und Kontrollansätze in Anteilen bei Testung von Abwasserproben

	Volumen in µl					Gesamt
	Proben- verdünnung	Vorkultur (Nährmedium + Inokulum)	Nährmedium OHNE Inoku- lum	Verdünnungs- wasser	Referenz- substanz	
Testansatz	160	40	-	-	-	200
Negativkontrollansatz	-	40	-	160	-	200
Positivkontrollansatz	-	40	-	140	20	200
Leerwertkontrollansatz für Testansatz	160	-	40	-	-	200
Leerwertkontrollansatz für Negativkontrollansatz	-	-	40	160	-	200
Leerwertkontrollansatz für Positivkontrollansatz	-	-	40	140	20	200

8.3.3 Abwasseranteil bei den verschiedenen Verdünnungsstufen

Verdünnungsstufe G*	Probenanteil in %	Absolute Volumenbestandteile in µl			
		Probe	Nährmedium und Inokulum	Verdünnungswasser	Gesamt
1.25	80	160	40	0	200
2	50	100	40	60	200
3	33.33	66.7	40	93.3	200
4	25	50	40	110	200
6	16.7	33.3	40	126.7	200
8	12.5	25	40	135	200
12	8.33	16.7	40	143.3	200
16	6.25	12.5	40	147.5	200

9 Inkubation

- Mikrottestplatte mit Abdeckung in der Klimakammer bei 28 °C unter ausreichendem Schütteln (950 rpm) 8 h inkubieren, so dass eine Sedimentation der Hefezellen vermieden wird.
- Nach Beendigung der Inkubationszeit erfolgt das Auslesen der Mikrottestplatte.
- Nach Beendigung des Tests ist die Mikrottestplatte durch Dampfsterilisation zu entsorgen. Problematische Substanzen sind den nationalen Vorschriften entsprechend getrennt zu entsorgen.

10 Messung

- Nach Ende der Inkubationsphase der Mikrottestplatte wird das Hefewachstum mit einem Lesegerät für Mikrottestplatten (Absorption bei 600 nm) ausgelesen.

11 Gültigkeitskriterien

Der Test wird nur dann als gültig betrachtet, wenn die Negativkontrollansätze unter den angegebenen Testbedingungen ein Mindestwachstum erreicht haben. Das Mindestwachstum gilt bei einer Erhöhung der anfänglich eingestellten Trübungswerte auf den mindestens fünffachen Wert als erreicht.

12 Auswertung

Die Wachstumshemmung wird durch den Vergleich der in den Testansätzen erreichten Trübung mit den Trübungswerten in den Negativkontrollansätzen ermittelt.

Zur Berechnung der Wachstumshemmung in Prozent ist folgende Formel zu verwenden:

$$I = \frac{G_c - G_t}{G_c} \times 100$$

- I = Wachstumshemmung in %
 G_c = Mittelwert der bei Testende in den Negativkontrollansätzen erreichten Trübungswerte abzüglich der zu Beginn ermittelten Werte.
 G_t = Mittelwert der bei Testende in den Testansätzen erreichten Trübungswerte abzüglich der Werte der zu Beginn ermittelten Werte.

Bestimmung des gentoxischen Potenzials von Wasserinhaltsstoffen unter Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae*

0 Allgemeines

Die vorliegende Arbeitsvorschrift beschreibt eine Teststrategie zum Nachweis und zur Bewertung gentoxischer Effekte in wässrigen Lösungen. Als biologische Komponente verwendet dieses Verfahren die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, einen eukaryotischen Organismus. Aufgrund des zellulären Aufbaus mit Organellen, Chromosomenstruktur, DNS-Reparaturmechanismen und metabolischen Prozessen, die insgesamt denen höherer Eukaryonten bis hin zu den Säugetieren stark ähneln, ist die Hefe ein vielseitiger und daher häufig verwendeter Modellorganismus. Die Verwendung dieses Organismus verbindet die Vorzüge eukaryotischer Testsysteme mit den Vorteilen prokaryotischer Verfahren hinsichtlich der kurzen Inkubationszeit, gut reproduzierbarer Wachstumsraten und einfacher Datenerhebung. Der auf *S. cerevisiae* basierende Test bietet ein robustes Verfahren mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

1 Anwendungsbereich

Das Verfahren kann zum Nachweis substanz- bzw. probenassoziierter gentoxischer Effekte in einem Testzeitraum von 8 h eingesetzt werden. Die Methode ist auf Wasser, Abwasser und auf chemische Monosubstanzen anwendbar, die unter den testspezifischen Bedingungen löslich sind. Für Monosubstanzen werden die erzielten Ergebnisse in international anerkannten Einheiten (z. B. mg/l) als die *lowest observed effective concentration (LOEC)* angegeben. Dabei handelt es sich um die Konzentration in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe, bei der zum ersten Mal eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals (siehe 1.1) festgestellt werden kann (im Folgenden: die Schwellenkonzentration). Bei komplexen Proben wird die Verdünnungsstufe (G-Wert) angegeben, bei der erstmals keine signifikante Erhöhung des Fluoreszenzsignals (siehe 1.1) in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe mehr festgestellt wird.

1.1 Toxikologischer Endpunkt

Das Nachweisverfahren basiert auf der transkriptionellen Aktivierung der, der humanen ATR-Kinase homologen *MEC1*-Signaltransduktionskaskade. Unter Einwirkung einer gentoxischen Substanz wird in den gentechnisch veränderten Hefezellen die Produktion einer für Hefen optimierten Version des grün fluoreszierenden Proteins (im Folgenden: GFP) aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* erhöht. Dieses Protein emittiert unter Anregung (485 nm) grünes Licht (511 nm), dessen Intensität mit entsprechenden Photodetektoren quantifiziert werden kann. Dabei ist die gemessene Intensität der Fluoreszenz (nach Bereinigung um die korrespondierende Zellzahl) proportional zum gentoxischen Effekt der Substanz bzw. der Probe.

2 Definitionen

Für die Verwendung dieser Vorschrift gelten die folgenden Definitionen.

2.1 Zellvermehrung

Zunahme der Zellzahl während der Versuchszeit.

2.2 Stammkultur

Kultur zur Bewahrung des ursprünglichen Teststammes im Laboratorium und zur Bereitstellung des Impfmateri als für die Stammkultur. Die Stammkultur wird bei -80 °C gelagert. Die Lagerungszeit sollte 1 Jahr nicht überschreiten. Überalterte Kulturen sind durch neue, bezüglich ihres Genotyps überprüfte Stammkulturen zu ersetzen.

2.3 Stammkultur

Kultur zur Bereitstellung des Impfmateri als für die Übernacht-Kultur.

2.4 Übernacht-Kultur

Kultur zur Vermehrung der Hefe für die Vorkultur.

2.5 Vorkultur

Hefekultur zur Bereitstellung des Inokulums für Test-, Negativkontroll- sowie Positivkontrollansatz.

2.6 Inokulum

Impfmateriel zur Herstellung von Test-, Negativkontroll- und Positivkontrollansatz.

2.7 Nährmedium

Wässrige Lösung von Nähr-, Vitamin und Mineralstoffen, die für das Wachstum der Hefe notwendig sind.

2.8 Testgut

Die zu untersuchende gelöste Substanz bzw. Probe. Dabei beinhaltet eine Probe das Material jeweils nach Abschluss aller Vorbereitungsmaßnahmen, wie Zentrifugation und pH-Wert-Einstellung.

2.9 Verdünnungsansatz

Mischung aus Testgut und Verdünnungswasser/Lösemittel in verschiedenen Volumenverhältnissen.

2.10 Testansatz

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und Verdünnungsansatz.

2.11 Negativkontrollansatz, Negativkontrolle

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und ggf. Lösemittel.

2.12 Positivkontrollansatz, Positivkontrolle

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und in Lösemittel gelöstem, gut untersuchten gentoxischen Stoff, z. B. 4 Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO) und ggf. Lösemittel.

2.13 Leerwertkontrolle für Testansatz

Mischung aus Nährmedium und Verdünnungsansatz.

2.14 Leerwertkontrolle für Negativkontrollansatz

Nährmedium und ggf. Lösemittel in der in den Testansätzen verwendeten Menge.

2.15 Leerwertkontrolle für Positivkontrollansatz

Mischung aus Nährmedium und in Lösemittel gelöstem, gut untersuchten gentoxischen Stoff, z. B. 4-Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO) und ggf. Lösemittel.

2.16 Verdünnungsstufe G

Das Volumenverhältnis einer Mischung der (Ab-)Wasserprobe mit Verdünnungswasser im Testansatz nach Zugabe von Inokulum und Nährmedium. Die testbedingt kleinstmögliche Verdünnung (Probe ohne Zusatz von Verdünnungswasser) ist 1:0,25 (Probe : Nährmedium [fünffach konzentriert] plus Inokulum). Diese Verdünnungsstufe wird als $G = 1,25$ bezeichnet. Üblicherweise werden zunächst die Verdünnungsstufen 1.25, 2, 3, 4, 6, 8, 12 und 16 hergestellt.

2.17 Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Zunahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des Testguts.

2.18 Testorganismus

S. cerevisiae ist ein einzelliger, eukaryotischer Organismus. Er gehört zum Reich der Pilze.

2.19 Indikatorstamm

Gentechnisch veränderter *S. cerevisiae* Stamm. Zum Nachweis gentoxischer Potenziale verfügt der Stamm über eine DNS schadensabhängige Promotorsequenz in Verbindung mit dem Reportergen gfp.

2.20 Kontrollstamm

Gentechnisch veränderter *S. cerevisiae* Stamm, der dem Nachweis der endogenen Hintergrundfluoreszenz dient. Der Stamm verfügt über die DNS schadensabhängige Promotorsequenz, nicht jedoch über eine funktionelle Version des Reporters gfp.

3 Grundlage des Verfahrens

Aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensität bei 535 nm im Negativkontrollansatz mit der durch Einwirkung des Testgutes induzierten Fluoreszenzintensität im Testansatz ergibt sich ein Maß für die Gentoxizität bzw. das erbgutverändernde Potenzial des untersuchten Materials nach einer definierten Einwirkzeit.

4 Störungen

Ungelöste Stoffe und Stoffe mit starken Fluoreszenzeigenschaften können das Testergebnis verfälschen und/oder die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen.

Bei stark gefärbten Proben oder gefärbtem bzw. trübem Abwasser können bei der photometrischen Messung Lichtverluste durch Absorption auftreten. Bei der Fluoreszenzmessung können stark gefärbte Proben oder gefärbtes bzw. trübes Abwasser die Hintergrundfluoreszenz beeinflussen. Derartige Effekte sind mit Hilfe der entsprechenden Leerwertkontrollen (2.13) zu überwachen.

5 Verwendete Stämme

Stamm	Plasmid	Relevanter Genotyp
<i>Ausgangsstamm</i> SCBH3TD		<i>MATa, his3D200, leu2-3, 112 trp1D901, ura3-52, suc2D9, pdr5::lox, snq2::lox, yor1::lox</i>
<i>Indikatorstamm</i> HLYRGI	pYEX-RAD54/GFP	wie SCBH3TD mit <i>RAD54/GFP, URA 3, LEU 2</i>
<i>Kontrollstamm</i> HLYRGlc	pYEX-RAD54/LEER	wie SCBH3TD mit <i>RAD54/-, URA 3, LEU 2</i>

6 Geräte

- Schüttleinrichtung für Mikrottestplatten (850-950 rpm)
- Schüttleinrichtung für Übernacht-Kulturen (250 rpm)
- pH-Messgerät
- Dampfsterilisator
- Pipetten
- Küvetten
- Photometer
- Kulturgefäße, bevorzugt Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 50 ml
- Mikrottestplatten mit transparentem Boden und mit Deckel, z. B. Greiner CELLSTAR #655185
- Lesegerät für Mikrottestplatten
- Klimakammer mit einer Inkubationstemperatur von 28 °C
- Petrischalen
- Waage
- Zahnstocher, dampfsterilisiert
- 50 ml Schraubdeckelgefäße
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Zentrifugen mit Rotoreinsätzen für 1,5 ml Reaktionsgefäße und für 50 ml Schraubdeckelgefäße
- Messkolben
- Röhreinrichtungen

7 Medien und Reagenzien

Als Reagenzien werden, soweit möglich, stets solche des Reinheitsgrades *zur Analyse* verwendet. Sämtliche Lösungen werden mit bidestilliertem Wasser oder Wasser gleichen Reinheitsgrades hergestellt.

7.1 Reagenzien

Die Angabe der verwendeten Reagenzien erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

- Agar, Agar-Agar, CAS [9002-18-0], Verfestigung des Nährmediums für Stammkulturen.
- Aminosäure *Drop-Out*-Mischung, Vorratsmenge.

Aminosäure	CAS-Nummer	Einwaage*
Adenin	73-24-5	250 mg
Arginin	74-79-3	100 mg
Asparagin	70-47-3	100 mg
Glutaminsäure	56-86-0	100 mg
Lysin	56-87-1	150 mg
Methionin	63-68-3	100 mg
Phenylalanin	63-91-2	250 mg
Serin	56-45-1	500 mg
Threonin	72-19-5	500 mg
Tryptophan	73-22-3	500 mg
Tyrosin	60-18-4	150 mg
Valin	72-18-4	300 mg

* oder ein Vielfaches

- DMSO, Dimethylsulfoxid, CAS [67-68-5], häufig verwendetes Lösemittel. Da DMSO über toxische Eigenschaften verfügt, ist bei Verwendung unbedingt darauf zu achten, dass die Konzentration in den Testansätzen 2 % (v/v) nicht übersteigt.
- Glucose-Stocklösung, dampfsterilisierte wässrige Lösung aus D-Glucose, CAS [50-99-7], 40%ig (m/v).
- Natriumhydroxid-Lösung, CAS [1310-73-2], $\alpha(\text{NaOH}) = 5 \text{ mol l}^{-1}$
ANMERKUNG: Zur Einstellung des pH-Wertes können gegebenenfalls auch schwächer konzentrierte Lösungen verwendet werden.
- 4-Nitroquinolin-1-oxid, CAS [56-57-5], gentoxische Referenzsubstanz.
- Salzsäure, CAS [7647-01-0], $\alpha(\text{HCl}) = 1 \text{ mol l}^{-1}$

- Supplement-Stocklösung, steriltfiltrierte Lösung aus L-Leucin, CAS [61-90-5], und L-Histidin, CAS [71-00-1] mit einer Konzentration von 4 mg ml⁻¹ bzw. 2 mg ml⁻¹.
- YNB (Yeast Nitrogen Base) Medium, ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, Difco Ref. 233520.
- Zitronensäure Monohydrat, CAS [5949-29-1], Puffer zur Beibehaltung des eingestellten pH-Wertes

7.2 Medium für Stamm-, Übernacht- und Vorkulturen (einfach konzentriert)

YNB (<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase) Medium	1,7 g l ⁻¹
Aminosäure <i>Drop-Out</i> -Mischung	0,5 g l ⁻¹
Zitronensäure Monohydrat	10,5 g l ⁻¹ (final: 50 mM)
A. bidest	Ad 1000 ml
Agar (nur für Stammkultur)	20 g l ⁻¹

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung je nach Fragestellung auf 4,75 bzw. 6,4 eingestellt. Nach der Dampfsterilisation (120°C, 20 min) werden der Lösung unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen 12,5 ml der 40%igen Glucose-Stocklösung (Finalkonzentration: 0,5 % [m/v]) zugegeben. Abschließend werden dem Nährmedium 10 ml der Supplement-Stocklösung zugegeben.

7.3 Medium für Vorkulturen bei Testung komplexer Proben (fünffach konzentriert)

Zur Erhöhung des Probenvolumens in den Ansätzen kann ein fünffach konzentriertes Nährmedium verwendet werden. Die Verwendung des konzentrierten Mediums ist bei komplexen Proben unerlässlich, kann aber auch bei Monosubstanzen nötig werden.

YNB (<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase) Medium	8,5 g l ⁻¹
Aminosäure <i>Drop-Out</i> -Mischung	2,5 g l ⁻¹
Zitronensäure Monohydrat	52,5 g l ⁻¹ (final: 250 mM)
A. bidest	Ad 1000 ml

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung je nach Fragestellung auf 4,75 bzw. 6,4 eingestellt. Nach der Dampfsterilisation (120°C, 20 min) werden der Lösung unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen 62,5 ml der 40%igen Glucose-Stocklösung (Finalkonzentration: 2,5 % [m/v]) zugegeben. Abschließend werden dem Nährmedium 50 ml der Supplement-Stocklösung zugegeben.

8 Durchführung

Einen Tag vor Beginn des Tests mit der Anzucht des Impfmateri als (Übernacht-Kulturen) beginnen.

8.1 Herstellen der verschiedenen Kulturen

8.1.1 Herstellen der Stammkultur

Wichtig: Die Stammkultur unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen herstellen und inkubieren!

- Vorsichtiges Auftauen der Stammkultur auf Eis
- Entnahme von 100 µl der aufgetauten Zellsuspension.
- Ausstreichen der Zellsuspension auf festem Nährmedium.
- Inkubation der beimpften Petrischalen für etwa 2 Tage bei 28 °C, bis sich ein dichter Zellrasen gebildet hat.
- Die Verwendung der so hergestellten Stammkultur ist für den Zeitraum von (maximal) einem Monat zulässig.

8.1.2 Ansatz der Übernacht-Kultur

Wichtig: Die Übernacht-Kultur unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen herstellen und inkubieren!

- Sterilen Erlenmeyerkolben mit etwa 10 ml Nährmedium (siehe 7.2) befüllen.
- Animpfen der Übernacht-Kulturen. Dazu wird mit Hilfe eines Zahnstochers Zellmaterial von den Stammkulturen entnommen und in das vorgelegte Medium überführt.
- Kolben mit luftdurchlässigem sterilem Stopfen verschließen.
- Über Nacht auf einem Schüttler (250 rpm) in der Klimakammer bei 28 °C inkubieren.

8.1.3 Ansatz der Vorkultur

Wichtig: Die Vorkultur unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen herstellen!

- Teilmenge aus der Übernacht-Kultur entnehmen und in 50 ml Schraubdeckelgefäß überführen.
- Zentrifugation der entnommenen Teilmenge bei 1725 x g.
- Restlose Entfernung des Überstandes (verbrauchtes Nährmedium) mit Hilfe geeigneter Pipetten. NICHT abschütten, da durch den entstehenden Rücklauf eine vollständige Entfernung des verbrauchten Mediums auf diese Weise nicht möglich ist.
- Aufnahme des Zellmaterials in geeigneter Menge des frischen Nährmediums (je nach Anwendung nach 7.2 bzw. 7.3) bis eine Trübung von $OD_{600} = 0,1$ (für Monosubstanzen) bzw. $OD_{600} = 0,5$ (für komplexe Proben) eingestellt ist.

8.2 Probenvorbereitung

8.2.1 Probenvorbereitung bei Testung von Monosubstanzen

Herstellung der Verdünnungsansätze als Mischung aus gelöster Reinsubstanz und Verdünnungswasser/Lösemittel in verschiedenen Volumenverhältnissen.

8.2.2 Probenvorbereitung bei Abwasserproben

- Schonendes Auftauen von gefrorenen Proben in einem Wasserbad bei einer Temperatur um 30 °C.
- Durchmischung durch vorsichtiges, mehrmaliges Invertieren des Probengefäßes.
- Entnahme der zu bearbeitenden Teilmenge.
- Einstellen des pH-Wertes auf 4,75 bzw. 6,4 mit Hilfe der Natriumhydroxid-Lösung bzw. der Salzsäure. Dabei die Konzentration der Säure bzw. Lauge so wählen, dass das zugegebene Volumen möglichst klein ist.
- Sollen enthaltene Schwebstoffe entfernt werden, wird die Probe bei 4000 x g in 50 ml Schraubdeckelgefäßen zentrifugiert.
- Herstellung der in 2.16 aufgeführten Verdünnungsreihe.
Für die spätere Verdünnungsstufe 1,25 wird die Probe unverdünnt eingesetzt. Für die spätere Verdünnungsstufe 2 wird zunächst eine Mischung aus Probe und Verdünnungswasser im Verhältnis 5:3 hergestellt. Durch 1:2 Verdünnungen dieser Mischung werden die späteren Verdünnungsstufen 4, 8 und 16 hergestellt. Für die spätere Verdünnungsstufe 3 wird zunächst eine Mischung aus Probe und Verdünnungswasser im Verhältnis 67:93 hergestellt. Durch 1:2 Verdünnungen dieser Mischung werden die späteren Verdünnungsstufen 6 und 12 hergestellt.

8.2.3 Vorbereitung der Referenzsubstanz für die Positivkontrollansätze

5 mg 4 Nitroquinolin-N-oxid in 5 ml DMSO lösen (kann portioniert bei -20 °C gelagert werden) und auf 500 µg/l mit einem DMSO-Wasser-Gemisch (3+7 Volumenanteile) einstellen. Weitere Verdünnungen mit Wasser sind möglich.

8.3 Belegung der Mikrotestplatten

Die Mikrotestplatten werden nach dem in Abbildung 1 dargestellten Pipettierschema belegt. Das Pipettierschema ist so gewählt, dass eine Beeinflussung der Testergebnisse durch die (geringen) Randeffekte minimiert wird. Jedes Experiment besteht aus einem Negativkontrollansatz und 4 Testkonzentrationen bzw. Verdünnungsstufen.

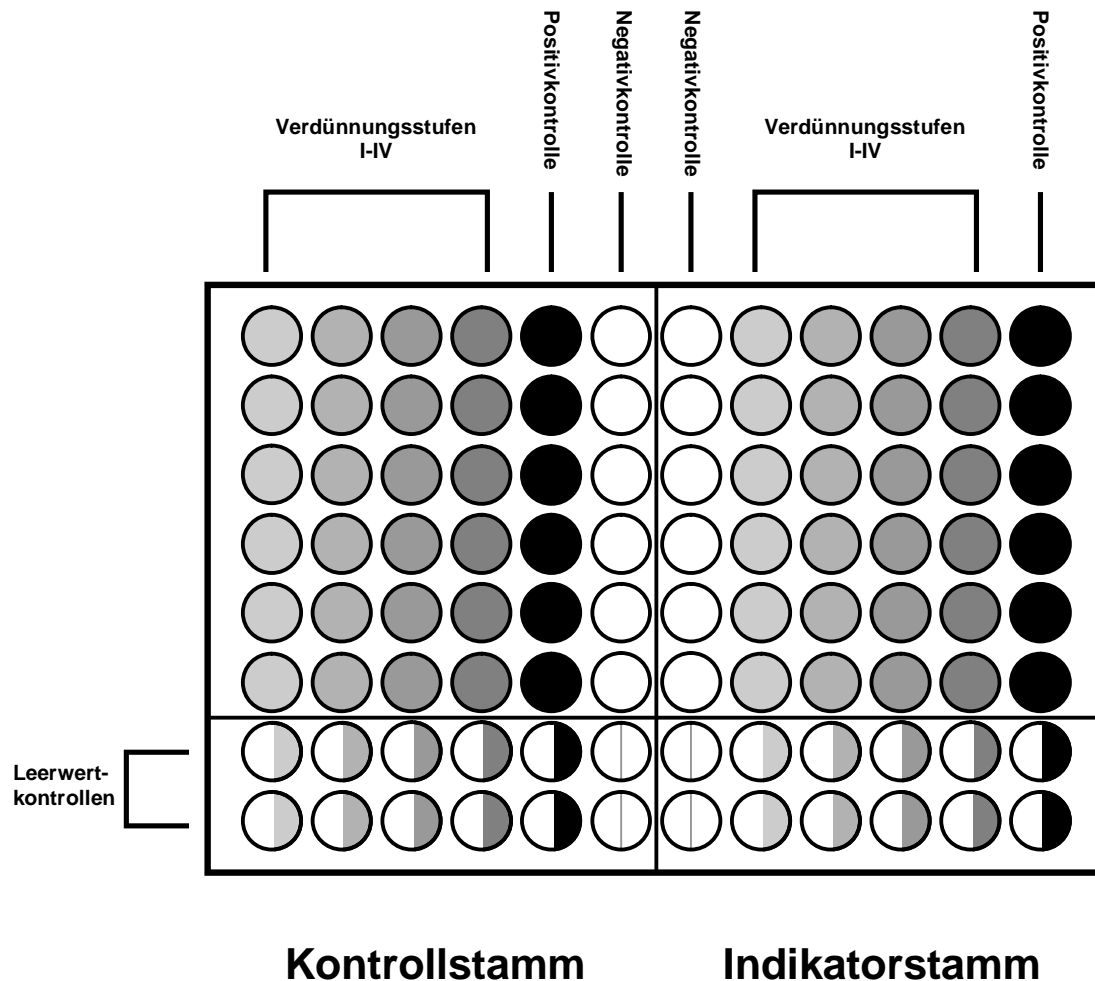


Abb. 1: Empfohlene Belegung der Mikrotestplatten.

8.3.1 Zusammensetzung der Test- und Kontrollansätze in Anteilen bei Testung von Monosubstanzen

	Volumen in µl					Gesamt
	Verdünnungs- ansatz	Vorkultur (Nährmedium + Inokulum)	Nährmedium OHNE Inoku- lum	Verdünnungs- wasser/ Lösemittel	Referenz- substanz	
Testansatz	20	180	-	-	-	200
Negativkontrollansatz	-	180	-	20	-	200
Positivkontrollansatz	-	180	-	-	20	200
Leerwertkontrollansatz für Testansatz	20	-	180	-	-	200
Leerwertkontrollansatz für Negativkontrollansatz	-	-	180	20	-	200
Leerwertkontrollansatz für Positivkontrollansatz	-	-	180	-	20	200

8.3.2 Zusammensetzung der Test- und Kontrollansätze in Anteilen bei Testung von Abwasserproben

	Volumen in µl					Gesamt
	Proben- verdünnung	Vorkultur (Nährmedium + Inokulum)	Nährmedium OHNE Inoku- lum	Verdünnungs- wasser	Referenz- substanz	
Testansatz	160	40	-	-	-	200
Negativkontrollansatz	-	40	-	160	-	200
Positivkontrollansatz	-	40	-	140	20	200
Leerwertkontrollansatz für Testansatz	160	-	40	-	-	200
Leerwertkontrollansatz für Negativkontrollansatz	-	-	40	160	-	200
Leerwertkontrollansatz für Positivkontrollansatz	-	-	40	140	20	200

8.3.3 Abwasseranteil bei den verschiedenen Verdünnungsstufen

Verdünnungsstufe G*	Probenanteil in %	Absolute Volumenbestandteile in µl			
		Probe	Nährmedium und Inokulum	Verdünnungswasser	Gesamt
1.25	80	160	40	0	200
2	50	100	40	60	200
3	33.33	66.7	40	93.3	200
4	25	50	40	110	200
6	16.7	33.3	40	126.7	200
8	12.5	25	40	135	200
12	8.33	16.7	40	143.3	200
16	6.25	12.5	40	147.5	200

9 Inkubation

- Mikrottestplatte mit Abdeckung in der Klimakammer bei 28 °C unter ausreichendem Schütteln (950 rpm) 8 h inkubieren, so dass eine Sedimentation der Hefezellen vermieden wird.
- Nach Beendigung der Inkubationszeit erfolgt das Auslesen der Mikrottestplatte.
- Nach Beendigung des Tests ist die Mikrottestplatte durch Dampfsterilisation zu entsorgen. Problematische Substanzen sind den nationalen Vorschriften entsprechend getrennt zu entsorgen.

10 Messung

- Nach Ende der Inkubationsphase der Mikrottestplatte wird das Hefewachstum mit einem Lesegerät für Mikrottestplatten (Absorption bei 600 nm) ausgelesen.
- Anschließend wird die Fluoreszenzentwicklung gemessen (Anregung 485 nm, Emission bei 535 nm).

11 Gültigkeitskriterien

Der Test wird nur dann als gültig betrachtet, wenn die Negativkontrollansätze unter den angegebenen Testbedingungen ein Mindestwachstum erreicht haben. Das Mindestwachstum gilt bei einer Erhöhung der anfänglich eingestellten Trübungswerte auf den mindestens fünffachen Wert als erreicht.

Bei einer Wachstumshemmung von mehr als 50 % wird das Fluoreszenzsignal nicht gewertet.

Wird beim Kontrollstamm für den Positivkontrollansatz ein positives Ergebnis erzielt, ist der Test ungültig. Wird beim Indikatorstamm für den Positivkontrollansatz ein negatives Ergebnis erzielt, ist der Test ebenfalls ungültig.

12 Auswertung

Als Kriterium für eine mögliche Gentoxizität der Probe wird der Quotient des geometrischen Mittels der um die Zellzahl bereinigten Messwerte der Testansätze einer Verdünnungsstufe zum geometrischen Mittel der um die Zellzahl bereinigten Messwerte der Negativkontrollansätze angesehen. Zur Berechnung dieses Quotienten werden zunächst die bereinigten Messwerte sowohl der Testansätze als auch der Negativkontrollansätze logarithmiert. Aus den logarithmierten Messwerten wird für Test- und Negativkontrollansätze das arithmetische Mittel gebildet.

Bezeichnet x_p den Mittelwert der Logarithmen der Kenngrößen der Testansätze und x_k den entsprechenden Mittelwert der Negativkontrollansätze, so gilt für die geometrischen Mittel m_p und m_k von Test- und Kontrollansätzen: $m_p = 10^{x_p}$ und $m_k = 10^{x_k}$. Der Quotient der beiden geometrischen Mittel ist $Q = 10^{(x_p - x_k)}$.

Der Unterschied, der zwischen den mittleren Logarithmen der Test- und der Negativkontrollansätze mindestens bestehen muss, damit die so genannte Nullhypothese, das heißt, dass die Mediane beider Kollektive gleich sind, auf dem Niveau 5 % abgelehnt werden kann, wird als *kleinste signifikante Differenz* bezeichnet. Diese kleinste signifikante Differenz ist das Produkt aus der 97,5 %- Perzentile der zentralen t-Verteilung mit $n_p + n_k$ Freiheitsgraden (n_p = Anzahl der Kavitäten des Testansatzes und n_k = Anzahl der Kavitäten der Negativkontrolle) und dem Standardfehler der Differenz. Bei der Berechnung des Standardfehlers wird davon ausgegangen, dass die Variabilitäten von Test- und Negativkontrollansätzen in etwa gleich sind, so dass es möglich ist, aus den empirischen Varianzen s_p^2 und s_k^2 einen Schätzwert für die gesamte Varianz nach folgender Formel zu berechnen:

$$(1) \quad s^2 = \frac{s_p^2 (n_p - 1) + s_k^2 (n_k - 1)}{n_p + n_k - 2}$$

Die empirischen Varianzen berechnen sich dabei über folgenden Formeln:

$$(2) \quad s_p^2 = \frac{\sum (x - x_p)^2}{n - 1}$$

und

$$(3) \quad s_k^2 = \frac{\sum (x - x_k)^2}{n - 1}$$

x stellt dabei den einzelnen bereinigten Messwert dar.

Die kleinste signifikante Differenz (ksd) berechnet sich dann nach der Formel:

$$(4) \quad \text{ksd} = t_{0,95, n_p+n_k-2} * s * \sqrt{1/n_p + 1/n_k}$$

Der Wert für t entspricht bei P = 5 und 10 Freiheitsgraden (Gesamtzahl der Kavitäten-2) dem Wert 1,81. Bei anderer Aussagewahrscheinlichkeit und/oder veränderter Belegung der Mikrotestplatten ist dieser Wert dem entsprechenden Wert der zentralen t-Verteilung anzupassen. Der Standardfehler der Differenz (s) errechnet sich aus der gemeinsamen Varianz (s^2), die nach Formel (1) errechnet wird und n_p und n_k geben die Zahl der Kavitäten für Test- und Negativkontrollansätze an. Delogarithmiert man den mit Formel (4) berechneten Wert, so erhält man den Signifikanzfaktor (10^{ksd}). Dieser Faktor stellt die gesuchte Schwelle zur Bewertung der möglichen Gentoxizität einer Probe in den Testansätzen dar. Übersteigt der Quotient der geometrischen Mittel der bereinigten Messwerte der Probe in den Testansätzen den Signifikanzfaktor, so kann die Probe in den Testansätzen mit einer Spezifität von 95 % als zumindest *möglicherweise gentoxisch* eingestuft werden. Wird dieser Schwellenwert nicht erreicht, dann ist höchstens mit einer 5%igen Wahrscheinlichkeit von einer *möglichen Gentoxizität* auszugehen.

12.1 Auswertungsschritte

1. Bereinigung der Fluoreszenzmesswerte um die Zellzahl. Dazu wird der Quotient aus den Messdaten (Fluoreszenz des Testansatzes bzw. Negativkontrollansatzes (Fluo_T) abzüglich der Fluoreszenz des zugehörigen Leerwertansatzes (Fluo_L)) und der erreichten Trübung des Testansatzes bzw. Negativkontrollansatzes OD_T abzüglich der Trübung des zugehörigen Leerwertansatzes OD_L errechnet.

$$(5) \quad (\text{FLUO}_T - \text{FLUO}_L) / (\text{OD}_T - \text{OD}_L)$$

2. Logarithmieren der Werte.
3. Bilden der arithmetischen Mittel der logarithmierten Werte des Negativkontrollansatzes (x_k) und des Testansatzes (x_p) in den verschiedenen Verdünnungsstufen.
4. Berechnung der Quotienten der geometrischen Mittel mit $Q = 10^{(x_p - x_k)}$ für alle Verdünnungsstufen.
5. Berechnen der Varianz der Testansätze (s_p^2) nach Formel (2) und der Varianz des Negativkontrollansatzes (s_k^2) nach Formel (3).
6. Mit der Formel (1) wird die gemeinsame Varianz errechnet (Jeweils für Negativkontrollansatz und Testansatz einer (!) Verdünnungsstufe).
7. Berechnen der kleinsten signifikanten Differenz mit Formel (4).
8. Bilden des Signifikanzfaktors (10^{ksd}).
9. Die Verdünnungsstufe bei der der Wert Q erstmals den Signifikanzfaktor übersteigt ist mit einer 95%igen Spezifität als gentoxisch einzustufen

Bestimmung des akut toxischen Potenzials von Wasserinhalstoffen unter Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae*

0 Allgemeines

Die vorliegende Arbeitsvorschrift beschreibt eine Teststrategie zum Nachweis und zur Bewertung akut toxischer Effekte in wässrigen Lösungen. Als biologische Komponente verwendet dieses Verfahren die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, einen eukaryotischen Organismus. Aufgrund des zellulären Aufbaus mit Organellen, Chromosomenstruktur, DNS-Reparaturmechanismen und metabolischen Prozessen, die insgesamt denen höherer Eukaryonten bis hin zu den Säugetieren stark ähneln, ist die Hefe ein vielseitiger und daher häufig verwendeter Modellorganismus. Die Verwendung dieses Organismus verbindet die Vorzüge eukaryotischer Testsysteme mit den Vorteilen prokaryotischer Verfahren hinsichtlich der kurzen Inkubationszeit, gut reproduzierbarer Wachstumsraten und einfacher Datenerhebung. Der auf *S. cerevisiae* basierende Test bietet ein robustes Verfahren mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

1 Anwendungsbereich

Das Verfahren kann zum Nachweis substanz- bzw. probenassoziierter akut toxischer Effekte in einem Testzeitraum von 3 h bzw. 4 h eingesetzt werden. Die Methode ist auf Wasser, Abwasser und auf chemische Monosubstanzen anwendbar, die unter den testspezifischen Bedingungen löslich sind. Für Monosubstanzen werden die erzielten Ergebnisse in international anerkannten Einheiten (z. B. mg/l) als die *effective concentration* (EC) angegeben, die eine Hemmung des Fluoreszenzsignals (Testparameter) von 20 % (EC_{20} -Wert) bzw. 50 % (EC_{50} -Wert) verursacht. Bei komplexen Proben wird die kleinste Verdünnungsstufe (G-Wert) in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe angegeben, bei der die Hemmung des Fluoreszenzsignals einen Wert von 20 % nicht mehr erreicht.

1.1 Toxikologischer Endpunkt

Das Nachweisverfahren basiert auf der transkriptionellen Deaktivierung des Pma1-ATPase-Gens unter Einwirkung toxischer Verbindungen. Dabei wird in den gentechnisch veränderten Hefezellen die Produktion einer für Hefen optimierten Version des grün fluoreszierenden Proteins (im Folgenden: GFP) aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* reduziert. Dieses Protein emittiert unter Anregung (485 nm) grünes Licht (511 nm), dessen Intensität mit entsprechenden Photodetektoren quantifiziert werden kann. Dabei ist die gemessene Abnahme der Fluoreszenzintensität (nach Bereinigung um die korrespondierende Zellzahl) proportional zum akut toxischen Effekt der Substanz bzw. der Probe.

2 Definitionen

Für die Verwendung dieser Vorschrift gelten die folgenden Definitionen.

2.1 Zellvermehrung

Zunahme der Zellzahl während der Versuchszeit.

2.2 Stammkultur

Kultur zur Bewahrung des ursprünglichen Teststammes im Laboratorium und zur Bereitstellung des Impfmateri als für die Stammkultur. Die Stammkultur wird bei -80 °C gelagert. Die Lagerungszeit sollte 1 Jahr nicht überschreiten. Überalterte Kulturen sind durch neue, bezüglich ihres Genotyps überprüfte Stammkulturen zu ersetzen.

2.3 Stammkultur

Kultur zur Bereitstellung des Impfmateri als für die Übernacht-Kultur.

2.4 Übernacht-Kultur

Kultur zur Vermehrung der Hefe für die Vorkultur.

2.5 Vorkultur

Hefekultur zur Bereitstellung des Inokulums für Test-, Negativkontroll- sowie Positivkontrollansatz.

2.6 Inokulum

Impfmateriel zur Herstellung von Test-, Negativkontroll- und Positivkontrollansatz.

2.7 Nährmedium

Wässrige Lösung von Nähr-, Vitamin und Mineralstoffen, die für das Wachstum der Hefe notwendig sind.

2.8 Testgut

Die zu untersuchende gelöste Substanz bzw. Probe. Dabei beinhaltet eine Probe das Material jeweils nach Abschluss aller Vorbereitungsmaßnahmen, wie Zentrifugation und pH-Wert-Einstellung.

2.9 Verdünnungsansatz

Mischung aus Testgut und Verdünnungswasser/Lösemittel in verschiedenen Volumenverhältnissen.

2.10 Testansatz

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und Verdünnungsansatz.

2.11 Negativkontrollansatz, Negativkontrolle

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und ggf. Lösemittel.

2.12 Positivkontrollansatz, Positivkontrolle

Mischung aus Nährmedium, Inokulum und in Lösemittel gelöstem, gut untersuchtem toxischen Stoff, z. B. 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP) und ggf. Lösemittel.

2.13 Leerwertkontrolle für Testansatz

Mischung aus Nährmedium und Verdünnungsansatz.

2.14 Leerwertkontrolle für Negativkontrollansatz

Nährmedium und ggf. Lösemittel in der in den Testansätzen verwendeten Menge.

2.15 Leerwertkontrolle für Positivkontrollansatz

Mischung aus Nährmedium und in Lösemittel gelöstem, gut untersuchten wachstumshemmenden Stoff, z. B. 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP) und ggf. Lösemittel.

2.16 Verdünnungsstufe G

Das Volumenverhältnis einer Mischung der (Ab-)Wasserprobe mit Verdünnungswasser im Testansatz nach Zugabe von Inokulum und Nährmedium. Die testbedingt kleinstmögliche Verdünnung (Probe ohne Zusatz von Verdünnungswasser) ist 1:0,25 (Probe : Nährmedium [fünffach konzentriert] plus Inokulum). Diese Verdünnungsstufe wird als $G = 1,25$ bezeichnet. Üblicherweise werden zunächst die Verdünnungsstufen 1.25, 2, 3, 4, 6, 8, 12 und 16 hergestellt.

2.17 Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Abnahme des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Konzentration des Testguts.

2.18 Testorganismus

S. cerevisiae ist ein einzelliger, eukaryotischer Organismus. Er gehört zum Reich der Pilze.

2.19 Indikatorstamm

Gentechnisch veränderter *S. cerevisiae* Stamm. Gegenüber bestimmten Substanzklassen sensitivierter Stamm zum Nachweis akut toxischer Eigenschaften einer Substanz oder Probe.

3 Grundlage des Verfahrens

Aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensität bei 535 nm im Negativkontrollansatz mit der durch Einwirkung des Testgutes induzierten Fluoreszenzintensität im Testansatz ergibt sich ein Maß für das akut toxische Potenzial des untersuchten Materials nach einer definierten Einwirkzeit.

4 Störungen

Ungelöste Stoffe und Stoffe mit starken Fluoreszenzeigenschaften können das Testergebnis verfälschen und/oder die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen.

Bei stark gefärbten Proben oder gefärbtem bzw. trübem Abwasser können bei der photometrischen Messung Lichtverluste durch Absorption auftreten. Bei der Fluoreszenzmessung können stark gefärbte Proben oder gefärbtes bzw. trübes Abwasser die Hintergrundfluoreszenz beeinflussen. Derartige Effekte sind mit Hilfe der entsprechenden Leerwertkontrollen (2.13) zu überwachen.

5 Verwendete Stämme

Stamm	Plasmid	Relevanter Genotyp
<i>Ausgangsstamm</i> SCBH3TD		<i>MATa, his3D200, leu2-3, 112 trp1D901, ura3-52, suc2D9, pdr5::lox, snq2::lox, yor1::lox</i>
<i>Indikatorstamm</i>	pYEX-pma1-yEGFP3/PEST	wie SCBH3TD mit <i>pma1-yEGFP3/PEST, URA 3, LEU 2</i>

6 Geräte

- Schüttleinrichtung für Mikrottestplatten (850-950 rpm)
- Schüttleinrichtung für Übernacht-Kulturen (250 rpm)
- pH-Messgerät
- Dampfsterilisator
- Pipetten
- Küvetten
- Photometer
- Kulturgefäße, bevorzugt Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 50 ml
- Mikrottestplatten mit transparentem Boden und mit Deckel, z. B. Greiner CELLSTAR #655185
- Lesegerät für Mikrottestplatten
- Klimakammer mit einer Inkubationstemperatur von 28 °C
- Petrischalen
- Waage
- Zahnstocher, dampfsterilisiert
- 50 ml Schraubdeckelgefäße
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Zentrifugen mit Rotoreinsätzen für 1,5 ml Reaktionsgefäße und für 50 ml Schraubdeckelgefäße
- Messkolben
- Rührreinrichtungen

7 Medien und Reagenzien

Als Reagenzien werden, soweit möglich, stets solche des Reinheitsgrades *zur Analyse* verwendet. Sämtliche Lösungen werden mit bidestilliertem Wasser oder Wasser gleichen Reinheitsgrades hergestellt.

7.1 Reagenzien

Die Angabe der verwendeten Reagenzien erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

- Agar, Agar-Agar, CAS [9002-18-0], Verfestigung des Nährmediums für Stammkulturen.
- Aminosäure *Drop-Out*-Mischung, Vorratsmenge.

Aminosäure	CAS-Nummer	Einwaage*
Adenin	73-24-5	250 mg
Arginin	74-79-3	100 mg
Asparagin	70-47-3	100 mg
Glutaminsäure	56-86-0	100 mg
Lysin	56-87-1	150 mg
Methionin	63-68-3	100 mg
Phenylalanin	63-91-2	250 mg
Serin	56-45-1	500 mg
Threonin	72-19-5	500 mg
Tryptophan	73-22-3	500 mg
Tyrosin	60-18-4	150 mg
Valin	72-18-4	300 mg

* oder ein Vielfaches

- 3,5-Dichlorphenol, CAS [591-35-5], Referenzsubstanz.
- DMSO, Dimethylsulfoxid, CAS [67-68-5], häufig verwendetes Lösemittel. Da DMSO über toxische Eigenschaften verfügt, ist bei Verwendung unbedingt darauf zu achten, dass die Konzentration in den Testansätzen 2 % (v/v) nicht übersteigt.
- Glucose-Stocklösung, dampfsterilisierte wässrige Lösung aus D-Glucose, CAS [50-99-7], 40%ig (m/v).
- Natriumhydroxid-Lösung, CAS [1310-73-2], $c(\text{NaOH}) = 5 \text{ mol l}^{-1}$
ANMERKUNG: Zur Einstellung des pH-Wertes können gegebenenfalls auch schwächer konzentrierte Lösungen verwendet werden.
- Salzsäure, CAS [7647-01-0], $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol l}^{-1}$
- Supplement-Stocklösung, sterilfiltrierte Lösung aus L-Leucin, CAS [61-90-5], und L-Histidin, CAS [71-00-1] mit einer Konzentration von 4 mg ml^{-1} bzw. 2 mg ml^{-1} .
- YNB (Yeast Nitrogen Base) Medium, ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, Difco Ref. 233520.
- Zitronensäure Monohydrat, CAS [5949-29-1], Puffer zur Beibehaltung des eingestellten pH-Wertes

7.2 Medium für Stamm-, Übernacht- und Vorkulturen (einfach konzentriert)

YNB (<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase) Medium	1,7 g l ⁻¹
Aminosäure <i>Drop-Out</i> -Mischung	0,5 g l ⁻¹
Zitronensäure Monohydrat	10,5 g l ⁻¹ (final: 50 mM)
A. bidest	Ad 1000 ml
Agar (nur für Stammkultur)	20 g l ⁻¹

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung je nach Fragestellung auf 4,75 bzw. 6,4 eingestellt. Nach der Dampfsterilisation (120°C, 20 min) werden der Lösung unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen 12,5 ml der 40%igen Glucose-Stocklösung (Finalkonzentration: 0,5 % [m/v]) zugegeben. Abschließend werden dem Nährmedium 10 ml der Supplement-Stocklösung zugegeben.

7.3 Medium für Vorkulturen bei Testung komplexer Proben (fünffach konzentriert)

Zur Erhöhung des Probenvolumens in den Ansätzen kann ein fünffach konzentriertes Nährmedium verwendet werden. Die Verwendung des konzentrierten Mediums ist bei komplexen Proben unerlässlich, kann aber auch bei Monosubstanzen nötig werden.

YNB (Yeast Nitrogen Base) Medium	8,5 g l ⁻¹
Aminosäure Drop-Out-Mischung	2,5 g l ⁻¹
Zitronensäure Monohydrat	52,5 g l ⁻¹ (final: 250 mM)
A. bidest	Ad 1000 ml

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung je nach Fragestellung auf 4,75 bzw. 6,4 eingestellt. Nach der Dampfsterilisation (120°C, 20 min) werden der Lösung unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen 62,5 ml der 40%igen Glucose-Stocklösung (Finalkonzentration: 2,5 % [m/v]) zugegeben. Abschließend werden dem Nährmedium 50 ml der Supplement-Stocklösung zugegeben.

8 Durchführung

Einen Tag vor Beginn des Tests mit der Anzucht des Impfmateri als (Übernacht-Kulturen) beginnen.

8.1 Herstellen der verschiedenen Kulturen

8.1.1 Herstellen der Stammkultur

Wichtig: Die Stammkultur unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen herstellen und inkubieren!

- Vorsichtiges Auftauen der Stammkultur auf Eis
- Entnahme von 100 µl der aufgetauten Zellsuspension.
- Ausstreichen der Zellsuspension auf festem Nährmedium.
- Inkubation der beimpften Petrischalen für etwa 2 Tage bei 28 °C, bis sich ein dichter Zellrasen gebildet hat.
- Die Verwendung der so hergestellten Stammkultur ist für den Zeitraum von (maximal) einem Monat zulässig.

8.1.2 Ansatz der Übernacht-Kultur

Wichtig: Die Übernacht-Kultur unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen herstellen und inkubieren!

- Sterilen Erlenmeyerkolben mit etwa 10 ml Nährmedium (siehe 7.2) befüllen.
- Animpfen der Übernacht-Kulturen. Dazu wird mit Hilfe eines Zahnstochers Zellmaterial von den Stammkulturen entnommen und in das vorgelegte Medium überführt.
- Kolben mit luftdurchlässigem sterilem Stopfen verschließen.
- Über Nacht auf einem Schüttler (250 rpm) in der Klimakammer bei 28 °C inkubieren.

8.1.3 Ansatz der Vorkultur

Wichtig: Die Vorkultur unter mikrobiologisch sterilen Bedingungen herstellen!

- Teilmenge aus der Übernacht-Kultur entnehmen und in 50 ml Schraubdeckelgefäß überführen.
- Zentrifugation der entnommenen Teilmenge bei 1725 x g.
- Restlose Entfernung des Überstandes (verbrauchtes Nährmedium) mit Hilfe geeigneter Pipetten. NICHT abschütten, da durch den entstehenden Rücklauf eine vollständige Entfernung des verbrauchten Mediums auf diese Weise nicht möglich ist.
- Aufnahme des Zellmaterials in geeigneter Menge des frischen Nährmediums (je nach Anwendung nach 7.2 bzw. 7.3) bis eine Trübung von OD₆₀₀ = 0,4 (für Monosubstanzen) bzw. OD₆₀₀ = 2,0 (für komplexe Proben) eingestellt ist.

8.2 Probenvorbereitung

8.2.1 Probenvorbereitung bei Testung von Monosubstanzen

Herstellung der Verdünnungsansätze als Mischung aus gelöster Reinsubstanz und Verdünnungswasser/Lösemittel in verschiedenen Volumenverhältnissen.

8.2.2 Probenvorbereitung bei Abwasserproben

- Schonendes Auftauen von gefrorenen Proben in einem Wasserbad bei einer Temperatur um 30 °C .
- Durchmischung durch vorsichtiges, mehrmaliges Invertieren des Probengefäßes.
- Entnahme der zu bearbeitenden Teilmenge.
- Einstellen des pH-Wertes, je nach Fragestellung, auf 4,75 bzw. 6,4 mit Hilfe der Natriumhydroxid-Lösung bzw. der Salzsäure. Dabei die Konzentration der Säure bzw. Lauge so wählen, dass das zugegebene Volumen möglichst klein ist.
- Sollen enthaltene Schwebstoffe entfernt werden, wird die Probe bei 4000 x g in 50 ml Schraubdeckelgefäßen zentrifugiert.
- Herstellung der in 2.16 aufgeführten Verdünnungsreihe.
Für die spätere Verdünnungsstufe 1,25 wird die Probe unverdünnt eingesetzt. Für die spätere Verdünnungsstufe 2 wird zunächst eine Mischung aus Probe und Verdünnungswasser im Verhältnis 5:3 hergestellt. Durch 1:2 Verdünnungen dieser Mischung werden die späteren Verdünnungsstufen 4, 8 und 16 hergestellt. Für die spätere Verdünnungsstufe 3 wird zunächst eine Mischung aus Probe und Verdünnungswasser im Verhältnis 67:93 hergestellt. Durch 1:2 Verdünnungen dieser Mischung werden die späteren Verdünnungsstufen 6 und 12 hergestellt.

8.2.3 Vorbereitung der Referenzsubstanz für die Positivkontrollansätze

3,5-Dichlorphenol in Wasser lösen (kann bei Raumtemperatur gelagert werden).

8.3 Belegung der Mikrotestplatten

Die Mikrotestplatten werden nach dem in Abbildung 1 dargestellten Pipettierschema belegt. Das Pipettierschema ist so gewählt, dass eine Beeinflussung der Testergebnisse durch die (geringen) Randeffekte minimiert wird. Jedes Experiment besteht aus einem Negativkontrollansatz und 4 Testkonzentrationen bzw. Verdünnungsstufen.

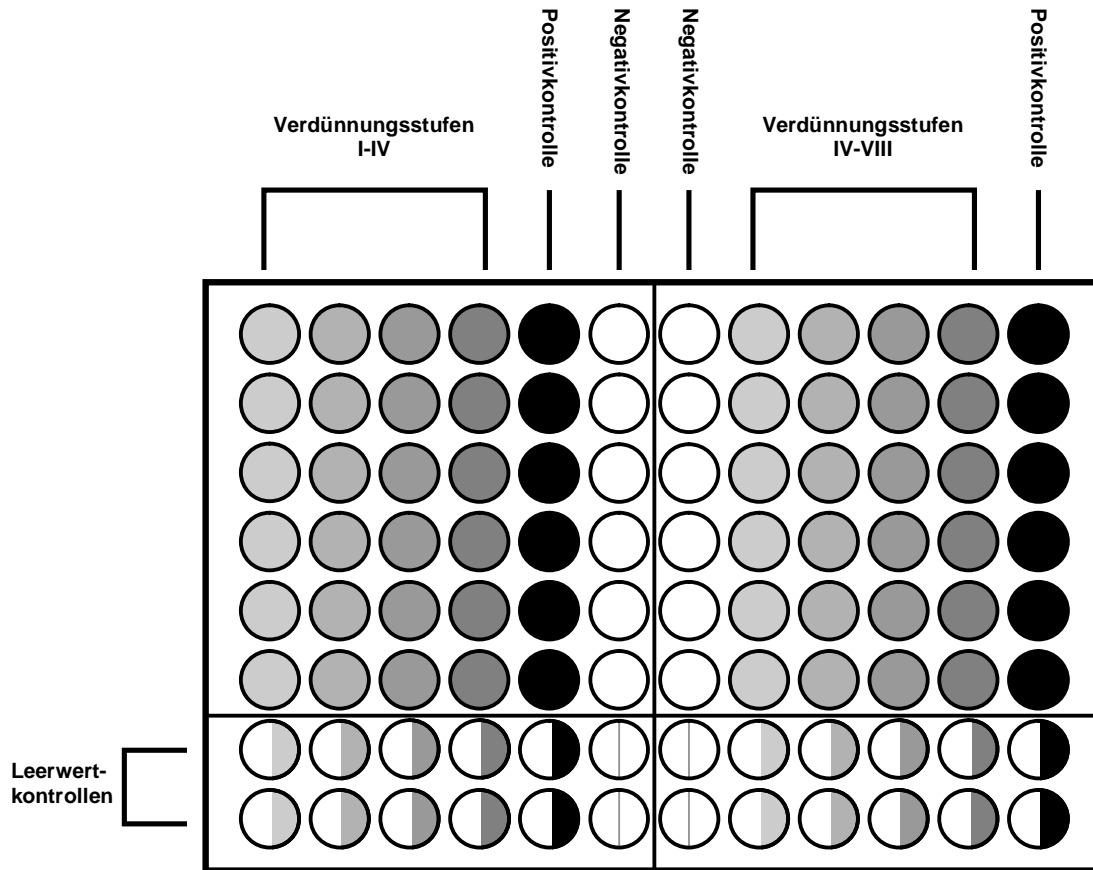


Abb. 1: Empfohlene Belegung der Mikrotestplatten. Zum Nachweis einer Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität unter Einfluss der Referenzsubstanz ist diese in den Positivkontrollen in zwei unterschiedlichen Konzentrationsstufen einzusetzen.

8.3.1 Zusammensetzung der Test- und Kontrollansätze in Anteilen bei Testung von Monosubstanzen

	Volumen in µl					Gesamt
	Verdünnungs- ansatz	Vorkultur (Nährmedium + Inokulum)	Nährmedium OHNE Inoku- lum	Verdünnungs- wasser/ Lösemittel	Referenz- substanz	
Testansatz	20	180	-	-	-	200
Negativkontrollansatz	-	180	-	20	-	200
Positivkontrollansatz	-	180	-	-	20	200
Leerwertkontrollansatz für Testansatz	20	-	180	-	-	200
Leerwertkontrollansatz für Negativkontrollansatz	-	-	180	20	-	200
Leerwertkontrollansatz für Positivkontrollansatz	-	-	180	-	20	200

8.3.2 Zusammensetzung der Test- und Kontrollansätze in Anteilen bei Testung von Abwasserproben

	Volumen in µl					Gesamt
	Proben- verdünnung	Vorkultur (Nährmedium + Inokulum)	Nährmedium OHNE Inoku- lum	Verdünnungs- wasser	Referenz- substanz	
Testansatz	160	40	-	-	-	200
Negativkontrollansatz	-	40	-	160	-	200
Positivkontrollansatz	-	40	-	140	20	200
Leerwertkontrollansatz für Testansatz	160	-	40	-	-	200
Leerwertkontrollansatz für Negativkontrollansatz	-	-	40	160	-	200
Leerwertkontrollansatz für Positivkontrollansatz	-	-	40	140	20	200

8.3.3 Abwasseranteil bei den verschiedenen Verdünnungsstufen

Verdünnungsstufe G*	Probenanteil in %	Absolute Volumenbestandteile in µl			
		Probe	Nährmedium und Inokulum	Verdünnungswasser	Gesamt
1.25	80	160	40	0	200
2	50	100	40	60	200
3	33.33	66.7	40	93.3	200
4	25	50	40	110	200
6	16.7	33.3	40	126.7	200
8	12.5	25	40	135	200
12	8.33	16.7	40	143.3	200
16	6.25	12.5	40	147.5	200

9 Inkubation

- Mikrottestplatte mit Abdeckung in der Klimakammer bei 28 °C unter ausreichendem Schütteln (950 rpm) 3 h bzw. 4 h inkubieren, so dass eine Sedimentation der Hefezellen vermieden wird.
- Nach Beendigung der Inkubationszeit erfolgt das Auslesen der Mikrottestplatte.
- Nach Beendigung des Tests ist die Mikrottestplatte durch Dampfsterilisation zu entsorgen. Problematische Substanzen sind den nationalen Vorschriften entsprechend getrennt zu entsorgen.

10 Messung

- Nach Ende der Inkubationsphase der Mikrottestplatte wird das Hefewachstum mit einem Lesegerät für Mikrottestplatten (Absorption bei 600 nm) ausgelesen.
- Anschließend wird die Fluoreszenzentwicklung gemessen (Anregung 485 nm, Emission bei 535 nm).

11 Gültigkeitskriterien

Der Test wird nur dann als gültig betrachtet, wenn sich die Trübung in den Negativkontrollansätzen unter den angegebenen Testbedingungen nicht um den Faktor 2 oder mehr erhöht hat.

Bei einer Wachstumshemmung von mehr als 20 % wird das Fluoreszenzsignal nicht gewertet.

Wird für die Positivkontrollansätze ein negatives Ergebnis erzielt, ist der Test ebenfalls ungültig.

12 Auswertung

Die Hemmung des Fluoreszenzsignals wird durch den Vergleich der in den Testansätzen erreichten Fluoreszenz mit den Fluoreszenzwerten in den Negativkontrollansätzen unter Berücksichtigung der Zellzahl ermittelt.

Zur Berechnung von Induktionsraten ist folgende Formel zu verwenden:

$$IR = (Ft/Gt) / (Fc/Gc)$$

IR = Induktionsrate

Fc = Mittelwert der in den Negativkontrollansätzen erreichten Fluoreszenzwerte abzüglich der Werte aus den

Ft = Mittelwert der in den Testansätzen erreichten Fluoreszenzwerte abzüglich der Werte aus den

Gc = Mittelwert der in den Negativkontrollansätzen erreichten Trübungswerte abzüglich der Werte aus den zugehörigen Leerwertkontrollansätzen

Gt = Mittelwert der in den Testansätzen erreichten Trübungswerte abzüglich der Werte aus den zugehörigen Leerwertkontrollansätzen

Eine Induktionsrate von 0,8 entspricht einer Hemmung des Fluoreszenzsignals von 20 Prozent.

Literaturverzeichnis

Aaij, C. und Borst, P. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochem. Biophys. Acta* **269**: 192–200

Adelmann, I. R. und Smith, L. L. 1976. Standard test fish development. I. Fathead minnows (*Pimephales promelas*) and goldfish (*Carassius auratus*) as standard fish in bioassays and their reaction to potential reference toxicants: 88. Duluth, Minnesota, US Environmental Protection Agency (Ecology Research Series No. EPA 600/3-76-061A).

Afanassiev, V., Sefton, M., Anantachaiyong, T., Barker, G., Walmsley, R. und Wölfl, S., 2000. Application of yeast cells transformed with GFP expression constructs containing the RAD54 or RNR2 promoter as a test for the genotoxic potential of chemical substances. *Mutat. Res.* **464**: 297–308

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson J. D., (Hrsg.) 1994. Molecular Biology of the Cell. 3rd Edition. Garland Publishing, Inc., New York & London. ISBN 0-8153-1620-8

Ambesi, A., Miranda, M., Petrov, V. V. und Slyman, C. W. 2000. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**: 155–160 ■

Ames, B. N., Lee, F. D. und Durston, W. E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 782–786

Anderson, B. G. 1946. The toxicity thresholds of various sodium salts determined by the use of *Daphnia magna*. *Sewage Works J.* **18**: 82–87

Anderson, B. G. 1944. The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. *Sewage Works J.* **16**: 1156–1165

Andrews, A. T. 1986. Electrophoresis, 2nd edition Oxford, UK: Clarendon Press.

ASTM. 2002. Standard Terminology relating to biological effects and environmental fate. Standard E 943-00 in: Annual Book of Standards. Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

Balzi, E. und Goffeau, A. 1995. Yeast multidrug resistance: the PDR network. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27(1)**: 71–76

Bankmann, M., Prakash, L. und Prakash, S. 1992. Yeast *RAD14* and human xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins. *Nature* **355(6360)**: 555–558

Baudouin, M.F. und Scoppa, P. 1974. Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **12(6)**: 745–751

Baun, A., Andersen, J. S. und Nyholm, N. 1999. Correcting for toxic inhibition in quantification of genotoxic response in the *umuC* test. *Mutat. Res.* **441**: 171–180

- Beltrame, P., Beltrame, P. L. und Carniti, P. 1984.** Inhibiting action of chloro- and nitrophenols on biodegradation of phenols: a structure-toxicity relationship. *Chemosphere* **13(1)**: 3–9
- Benoit-Guyod, J.-L., André, C., Taillandier, G., Rochat, J., und Boucherle, A. 1984.** Toxicity and QSAR of chlorophenols on *Lebistes reticulatus*. *Ecotoxical. Environ. Saf.* **8**: 227–235
- Bergman, K., Müller, L. und Teigen, S. W. 1996.** Series: current issues in mutagenesis and carcinogenesis, No. 65. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re)view. *Mutat. Res.* **349(2)**: 263–288
- Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martínez, P. und Ljungdahl, P. O. 2003.** Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol. Microbiol.* **47**: 767–780
- Beyersmann, D. und Hechtenberg, S. 1997.** Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144(2)**: 247–261
- Beyersmann, D. 1994.** Interactions in metal carcinogenicity. *Toxicol. Lett.* **72(1-3)**: 333–338
- Bezzubova, O., Silbergleit, A., Yamaguchi-Iwai, Y., Takeda, S. und Buerstedde, J. M. 1997.** Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a *RAD54*-/- mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell* **89**: 185–193
- Bhunya, S. P. und Jena, G. B. 1992.** Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (gamma-BHC): an *in vivo* study in chicks. *Mutat. Res.* **272(2)**: 175–181
- Bianchi, L., Zannoli, A., Pizzala, R., Stivala, L. A. und Chiesara, E. 1994.** Genotoxicity assay of five pesticides and their mixtures in *Saccharomyces cerevisiae* D7. *Mutat. Res.* **321(4)**: 203–211
- Biedermann, K. A., Landolph, J. R. 1990.** Role of valence state and solubility of chromium compounds on induction of cytotoxicity, mutagenesis, and anchorage independence in diploid human fibroblasts. *Cancer Res.* **50(24)**: 7835–7842
- Biesinger, K.E. und Christensen, G.M. 1972.** Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *J. Fish. Res. Board. Can.* **29(12)**: 1691–1700
- Birge, W. J., Black, J. A., Westermann, A. G., Short, T. M., Taylor, S. B., Bruser, D. M. und Wallingford, E. D. 1985.** Recommendations on numerical values for regulating iron and chloride concentrations for the purpose of protecting warmwater species of aquatic life in the commonwealth Kentucky. University of Kentucky, Lexington, KY. (NTIS A 5514).
- Birge, W. J. 1978.** Aquatic toxicology of trace elements of coal and fly ash. Energy and Environmental Stress in Aquatic Systems. In Thorp & Gibbons (Hrsg.): *Symposia Health Nov 2-4*, 1977. Savannah River Ecology Laboratory, Institute of Ecology, University of Georgia, US Department of Energy, Technical Information Centre. CONF-771114.
- Björk, M. 1995.** Bioavailability and uptake of hydrophobic organic contaminants in bivalve filter-feeders. *Annales Zoologici Fennici* **32**: 237–245
- Blaise, C., Legault, R., Bermingham, N., van Coillie, R. und Vasseur, P. 1986.** A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxic. Assess.* **1**: 261–281

- Blanchard, J. 1982.** Protein binding of caffeine in young and elderly males. *J. Pharm. Sci.* **71(12)**: 1415–1418
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R. und Viarengo, A. 1999.** Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ. Mol. Mutagen.* **33(4)**: 287–292
- Borcherding, J. und Jantz, B. 1997.** Valve movement response of the mussel *Dreissena polymorpha* – the influence of pH and turbidity on the acute toxicity of pentachlorophenol under laboratory and field conditions. *Ecotoxicol.* **6**: 153–165
- Bort, R., Ponsoda, X., Jover, R., Gómez-Lechón, M. J. und Castell, J. V. 1998.** Diclofenac toxicity to hepatocytes : A role for drug metabolism in cell toxicity. *JPET* **288**: 65–72 ■
- Boutet, C. und Chaisemartin, C. 1973.** Propriétés toxiques spécifiques des sels métalliques chez *Austropotamobius pallipes pallipes* et *Orconectes limosus*. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie (Paris)* **167**:1933–1938.
- Boutry, M., Foury, F. und Goffeau A. 1977.** Energy-dependent uptake of calcium by the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* **464(3)** : 602–612
- Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H. und Jacquet, M. 1998.** Msn2p und Msn4p control a large number genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180**: 1044–1052
- Brennan, R. J. und Schiestl, R. H. 1996.** Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat. Res.* **356(2)**: 171–178
- Broderius, S. J., Kahl, M. D. und Hoglund, M. D. 1995.** Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **14(9)**: 1591–1605
- Brose, M. S., Rebbeck, T. R., Calzone, K. A., Stopfer, J. E., Nathanson, K. L., Weber, B. L. 2002.** Cancer risk estimates for *BRCA1* mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**:1365–72 ■
- Brunborg, G., Holme, J. A. und Hongslo, J. K. 1995.** Inhibitory effects of paracetamol on DNA repair in mammalian cells. *Mutat. Res.* **342(3-4)**: 157–170
- Bruner, K. A., Fisher, S. W. und Landrum, P. F. 1994.** The role of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in contaminant cycling. The effect of body size and lipid content on the bioconcentration of pcbs and pahs. *Great Lakes Res.* **20**: 725–734
- Buikema, A. L., Jr., Sullivan, G. W. und Cairns, J., Jr. 1974.** Evaluation of *Philodia acuticornis* (Rotifera) as a bioassay organism for heavy metals. *Water Resour. Bull.* **10**: 648–661
- Cahill, P. A., Knight, A. W., Billinton, N., Barker, M. G., Walsh, L., Keenan, P. O., Williams, C. V., Tweats, D. J. und Walmsley, R. M. 2004.** The GreenScreen® genotoxicity assay: a screening validation programme. *Mutagen.* **19(2)**:105 – 119
- Calleja, M. C., Persoone, G. und Geladi, P. 1994.** Comparative acute toxicity of the first 50 Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **26(1)**: 69–78

- Calleja, M. C. und Persoone, G. 1992.** Cyst-based toxicity tests. IV. The potential of ecotoxicological tests for the prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme. *ATLA. Altern. lab. anim.* **20(3)**: 396-405
- Capieaux, E., Vignais, M.-L., Sentenac, A. und Goffeau, A. 1989.** The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J. Biol. Chem.* **264(13)**: 7437-7446 ■
- Carmargo, J. A. und Tarazona, J. V. 1991.** Short-term toxicity of ion (F⁻) in soft water to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and brown trout (*Salmo trutta fario*). *Fluoride* **24(2)**: 76-83
- Casadevall, M. und Kortenkamp, A. 1995.** The formation of both apurinic/apyrimidinic sites and single-strand breaks by chromate and glutathione arises from attack by the same single reactive species and is dependent on molecular oxygen. *Carcinogenesis* **16(4)**: 805-809
- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C. und Landriscina, C. 2002.** Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* **179**: 37-50
- Casida, J. E. 1993.** Insecticide action at the GABA-gated chloride channel: recognition, progress, and prospects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **22(1-2)**: 13-23
- Cavas, T., Garanko, N. N. und Arkhipchuk, V. V. 2005.** Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem. Toxicol.* **43(4)**: 569-574
- Chamouard, J. M., Barre, J., Urien, S., Houin, G. und Tillement, J. P. 1985.** Diclofenac binding to albumin and lipoproteins in human serum. *Biochem. Pharmacol.* **34(10)**: 1695-1700
- Chan, K. K., Vyas, K. H. und Brandt, K. D. 1987.** *In vitro* protein binding of diclofenac sodium in plasma and synovial fluid. *J. Pharm. Sci.* **76(2)**: 105-108
- Chan, P. C., Peller, O. G. und Kesner, L. 1982.** Copper(II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membranes. *Lipids* **17**: 331-337
- Cherest, H., Davidian, J. C., Thomas, D., Benes, V., Ansorge, W. und Surdin-Kerjan, Y., 1997.** Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**: 627-635 ■
- Chien, A., Edgar, D. B. und Trela, J. M. 1976.** Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127(3)**: 1550-1557 ■
- Christensen, E.R. und Nyholm, N. 1984.** Ecotoxicological assays with algae: Weibull dose-response curves. *Env. Sci. Technol.* **19**: 713-718
- Cid, A., Perona, R. und Serrano, R. 1987.** Replacement of the promoter of the yeast plasma membrane ATPase gene by a galactose-dependent promoter and its physiological consequences. *Curr. Genet.* **12(2)**: 105-110
- Clemedson, C., McFarlane-Abdulla, E., Andersson, M., Barile, F. A., Calleja, M. C., Chesné, C., Clothier, R., Cottin, M., Curren, R., Daniel-Szolgay, E., Dierickx, P., Ferro, M., Fiskesjö, G., Garza-Ocañas, L., Gómez-Lechón, M. J., Gülden, M., Isomaa, B., Janus, J., Judge, P., Kahru, A., Kemp, R. B., Kerszman, G., Kristen, U., Kunimoto, M., Kärenlampi, S., Lavrijsen, K., Lewan, L., Lilius, H., Ohno, T., Persoone, G., Roguet, R., Romert, L., Sawyer, T. W., Seibert, H., Shrivastava, R., Stamatii, A., Tanaka, N., Torres-Alanis, O., Voss, J.-U., Wakuri, S., Walum, E., Wang, X., Zucco, F. und Ekwall, B., 1996.** MEIC Evaluation of acute systemic toxicity. *ATLA* **24**: 273-311

- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D. H. und zur Nieden, U., 2002.** A transporter in the endoplasmatic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J. Biol. Chem.* **277**: 18215–18221 ■
- Codina, J. C., Perez-Torrente, C., Perez-Garcia, A., Cazorla, F. M. und de Vicente, A. 1995.** Comparison of microbial tests for the detection of heavy metal genotoxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29(2)**: 260–265
- Cohen, S. N. 1975.** The manipulation of genes. *Sci. Am.* **233(1)**: 24–33
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W. und Helling, R. B. 1973.** Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Acad. Sci. USA* **70(11)**: 3240–3244 ■
- Cole, G. M. und Mortimer, R. K. 1989.** Failure to induce a DNA repair gene, RAD54, in *Saccharomyces cerevisiae* does not affect DNA repair or recombination phenotypes. *Mol. Cell. Biol.* **9(8)**: 3314–3322 ■
- Coleman, R. D., Coleman, R. L. und Rice, E. L. 1971.** Zinc and cobalt bioconcentration and toxicity in selected algal species. *Bot. Gaz.* **132**: 102–109
- Conklin, D. S., Kung, C. und Culbertson, M. R. 1993.** The COT2 gene is required for glucose-dependent divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **13**: 2041–2049
- Conklin, D. S., McMaster, J. A., Culbertson, M. R. und Kung, C. 1992.** COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3678–3688 ■
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A. R., Falkow, S. und Brown, A. J. P. 1997.** Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiol.* **143**: 303–311 ■
- Corrigan, A. J. und Huang, P. C. 1981.** Cellular uptake of cadmium and zinc. *Biol. Trace Elem. Res.* **3**: 197–216
- Couch, F. J., Farid, L. M., De Shano, M. L., Tavtigian, S. V., Calzone, K., Campeau, L., Peng, Y., Bogden, B., Chen, Q., Neuhausen, S., Shattuck-Eidens, D., Godwin, A. K., Daly, M., Radford, D. M., Sedlacek, S., Rommens, J., Simard, J., Garber, J., Merajver, S. und Weber, B. L. 1996.** BRCA2 germ line mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat. Genet.* **13**:123–125
- Countryman, P. I. und Heddle, J. A. 1976.** The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* **41(2-3)**: 321–332.
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. und Tsien, R. Y. 1995.** Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci.* **20**: 448–455
- Currie, R. S., Muir, D. C. G., Fairchild, W. L., Holoka, M. H. und Hecky, R. E. 1998.** Influence of nutrient additions on cadmium bioaccumulation by aquatic invertebrates in littoral enclosures. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 2435–2443
- Curtis, M.W. und Ward, C.H. 1981.** Aquatic toxicity of forty industrial chemicals: testing in support of hazardous substance spill prevention regulation. *J. Hydrol.* **51**: 359–367

- Curtis, M. W., Copeland, T. L. und Ward, C. H. 1979.** Acute toxicity of 12 industrial chemicals to freshwater and saltwater organisms. *Water Res.* **13**: 137–142
- Cusimano, R. F. und Brakke, D. F. 1986.** Effect of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**: 1497–1502
- D'Ambrosio, S. M. 1994.** Evaluation of the genotoxicity data on caffeine. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **19**(3): 243–281
- Davies, N. A. und Simkiss, K. 1996.** The uptake of zinc from artificial sediments by *Mytilus edulis*. *Mar. Biol. Assn. UK* **76**: 1073–1079
- Davis, D. C., Potter, W. Z., Jollow, D. J. und Mitchell, J. R. 1974.** Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sci.* **14**: 2099–2109
- Da Cruz Fresco, P. und Kortenkamp, A. 1994.** The formation of DNA cleaving species during the reduction of chromate by ascorbate. *Carcinogenesis* **15**(9): 1773–1778
- De Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D. und Zanicchi P. 1990.** Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat. Res.* **238**(2): 99–172
- De Lima, P. D. L., Cardoso, P. C., Khayat, A. S., de Oliveira Bahia, M. und Burbano, R. R. 2003.** Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an *in vitro* study. *Genet. Mol. Res.* **2**(3): 328–333 ■
- De Schampheleere, K. A., Vasconcelos, F. M., Heijerick, D. G., Tack, F. M., Delbecke, K., Allen, H. E. und Janssen, C. R. 2003.** Development and field validation of a predictive copper toxic model for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 2454–2465
- Devillers, J. und Chambon, P. 1986.** Acute toxicity and QSAR of chlorophenols on *Daphnia magna*. *Bull. environ. Contam. Toxicol.* **37**: 599–605
- Diamond, J. M., Winchester, E. L., Mackler, D. G., Rasnake, W. J., Fanelli, J. K. und Gruber, D. 1992.** Toxicity of cobalt to freshwater indicator species as a function of water hardness. *Aquatic Toxicol.* **22**: 163–180
- Dillon, C. T., Lay, P. A., Cholewa, M., Legge, G. J., Bonin, A. M., Collins, T. J., Kostka, K. L. und Shea-McCarthy, G. 1997.** Microprobe X-ray absorption spectroscopic determination of the oxidation state of intracellular chromium following exposure of V79 Chinese hamster lung cells to genotoxic chromium complexes. *Chem. Res. Toxicol.* **10**(5): 533–535
- Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A., Eide, D. J. 1994.** The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**: 26092–26099
- Dmitrieva, N. I., Cai, Q. und Burg, M. B. 2004.** Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and *in vivo*. *PNAS* **101**(8): 2317–2322 ■
- Donehower, R. C. 1992.** An overview of the clinical experience with hydroxyurea. *Semin. Oncol.* **19**(9): 11–19
- Dowden, B. F. und Bennett, H. J. 1965.** Toxicity of selected chemicals to certain animals. *J. Water Pollut. Control. Fed.* **37**(9): 1308–1316

- Dreier, J., Breitmaier, E. B., Gocke, E., Apfel, C. M. und Page M. G. 2002. Direct influence of S9 liver homogenate on fluorescence signals: impact on practical applications in a bacterial genotoxicity assay. *Mutat. Res.* **13(1-2)**: 169–182
- Dufour, J. P. und Goffeau, A. 1978. Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **253(19)**: 7026–7032 ■
- Duttka, J. und Kwan., K. 1981. Comparison of three microbial toxicity screening tests with the microtox test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **27**: 753–757
- Dutka, B.J. und Kwan, K.K. 1984. Studies in a synthetic activated sludge toxicity screening procedure with comparison to three microbial toxicity tests. In D. Liu und B. J. Dutka (Hrsg.): Toxicity screening procedures using bacterial systems: 125-138. New York, Basel, Marcel Dekker Inc.
- Dybing E., Holme, J. A., Gordon, W. P., Soderlund, E. J., Dahlin, D. C. und Nelson, S. D. 1984. Genotoxicity studies with paracetamol. *Mutat. Res.* **138(1)**: 21–32
- Eisen, J. A., Sweder, K. S. und Hanawalt, P. C. 1995. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.* **23**: 2715–2723 ■
- Elledge, S. J. 1996. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**: 1664–1672
- Engler, M. J. und Richardson, C.C. 1982. DNA ligases. In P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*. Academic Press Inc., San Diego, **15(b)**: 3–30
- EPA 2000. Understanding and accounting for method variability in whole effluent toxicity applications under the national pollutant discharge elimination system. June 2000. EPA 833-R-00-003.
- EPA 1971. Algal assay procedure bottle test. National Eutrophication Research Program, Corvallis, Oregon, 82.
- EPA 1971. Water Quality Criteria Data Book: Effects of chemicals on aquatic life; EPA, Water Quality Office, Washington, D. C. **3**: A 128–130
- Eraso, P. und Gancedo, C. 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **224(1)**: 187–192
- Esser, J. R., Hendriks, R.W., Swagemakers, S. M., Troelstra, C., de Wit, J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. und Kanaar, R. 1997. Disruption of mouse *RAD54* reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* **89**: 195–204
- Esteller, M., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Watkins, D. N., Issa, J.-P. J., Sidransky, D., Baylin, S. B. und Herman, J. G. 2000. Inactivation of the DNA repair gene *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase* by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in *K-ras* in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* **60**: 2368–2371 ■
- Ewell, W.S., Gorsuch, J.W., Kringle, R. O., Robillard, K. A. und Spiegel, R. C. 1986. Simultaneous evaluation of the acute effects of chemicals on seven aquatic species. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**: 831–840

- Fabiani, R., De Bartolomeo, A. und Morozzi G. 2005.** Involvement of oxygen free radicals in the serum-mediated increase of benzoquinone genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* [Epub ahead of print]
- Fang, S. C. und Fallin, E. 1976.** The binding of various mercurial compounds to serum proteins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **15(1)**: 110–117
- Fernandes, A. R. und Sá-Correia, I. 2003.** Transcription patterns of *PMA1* and *PMA2* genes and activity of plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast* **20**: 207–219 ■
- Fernandes, A. R., Peixoto, F. P. und Sá-Correia, I. 1998.** Activation of the H⁺-ATPase in the plasma membrane of cells of *Saccharomyces cerevisiae* grown under mild copper stress. *Arch. Microbiol.* **171**: 6–12
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Frayse, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R. und Poll, J. 2004.** Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* **23(5)**: 1344–1354
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. 1983.** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132(1)**: 6–13
- Fish, F., Lampert, I., Halachmi, A., Riesenfeld, G. und Herzberg, M. 1987.** The SOS Chromotest kit: A rapid method for the detection of genotoxicity. *Toxic. Assess.* **2**: 135–147
- Flowers, L., Ohnishi, S. T. und Penning, T. M. 1997.** DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and o-semiquinone anion radicals. *Biochemistry* **36(28)**: 8640–8648
- Foury, F., Boutry, M. und Goffeau, A. 1977.** Efflux of potassium induced by Dio-9, a plasma membrane ATPase inhibitor in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **252(13)**: 4577–4583 ■
- Foury, F. und Goffeau, A. 1975.** Stimulation of active uptake of nucleosides and amino acids by cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **250(6)**: 2354–2362 ■
- Gadd, G. M., Mowll, J. L., White, C. und Newby, P. J. 1986.** Methods for assessment of heavy metals toxicity towards fungi and yeasts. *Toxicol. Assess.* **1**: 169–185
- Gagnon, C. und Fisher, N. S. 1997.** The bioavailability of sediment-bound Cd, Co, and Ag to the mussel *Mytilus edulis*. *Can. Fish. Aquat. Sci.* **54**: 147–156
- Galloway, S. M., Deasy, D. A., Bean, C. L., Kraynak, A. R., Armstrong M. J. und Bradley, M. O. 1987.** Effects of high osmotic strength on chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and DNA strand breaks, and the relation to toxicity. *Mutat. Res.* **189(1)**: 15–25
- Gant, D., Eldefrawi, M. und Eldefrawi, A. 1987.** Cyclodiene insecticides inhibit GABA receptor-regulated chloride transport. *Tox. Appl. Pharmacol.* **88**: 313–321
- Gasch, A. P., Huang, M., Metzner, S., Botstein, D., Elledge, S. J. und Brown, P. O. 2001.** Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol. Biol. Cell* **12(10)**: 2987–3003 ■

- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. und Brown, P. O. 2000.** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4241–4257 ■
- Gee, P., Maron, D. M. und Ames, B. N. 1994.** Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11606–11610
- Gellert, G. 2000.** Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **45**: 87–91
- Gellert, G., Stommel, A. und Trujillano, A. 1999.** Development of an optimal bacterial medium based on the growth inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* **39**: 467–476
- Gitan, R. S., Luo, H., Rodgers, J., Broderius, M. und Eide, D., 1998.** Zinc induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J. Biol. Chem.* **273**: 28617–28624 ■
- Glaab, W. E., Tindall, K. R. und Skopek, T. R. 1999.** Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines. *Mutat. Res.* **427(2)**: 67–78
- Gosh, M., Shen, J. und Rosen, B. P. 1999.** Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5001–5006
- Gradmann, D., Hansen, V. P., Long, W. S. und Slayman, C. L. 1978.** Current-voltage relationships for the plasma membrane and its principal electrogenic pump in *Neurospora crassa*: I. Steady-state conditions. *J. Membr. Biol.* **39(4)**: 333–367
- Graschopf, A., Stadler, J. A., Hoellerer, M. K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S. D. und Schweyen, R. J. 2001.** The yeast plasma membrane protein Alr1 controls Mg^{2+} homeostasis and is subject to Mg^{2+} -dependent control of its synthesis and degradation. *J. Biol. Chem.* **276**: 16216–16222 ■
- Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O. und Winge, D. R. 2000.** Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J. Biol. Chem.* **275**: 32310–32316
- Grzesiuk, E. 1998.** The role of mutation frequency decline and SOS repair systems in methyl methanesulfonate mutagenesis. *Acta Biochim. Pol.* **45(2)**: 523–533
- Guecheva, T., Henriques, J. A. und Erdtmann, B. 2001.** Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat. Res.* **497(1-2)**: 19–27
- Guzder, S. N., Sung, P., Prakash, L. und Prakash, S. 1998a.** The DNA-dependent ATPase activity of yeast nucleotide excision repair factor 4 and its role in DNA damage recognition. *J. Biol. Chem.* **273(11)**: 6292–6296 ■
- Guzder, S. N., Sung, P., Prakash, L. und Prakash, S. 1998b.** Affinity of yeast nucleotide excision repair factor 2, consisting of the Rad4 and Rad23 proteins, for ultraviolet damaged DNA. *J. Biol. Chem.* **273(47)**: 31541–31546 ■
- Guzder, S. N., Sung, P., Prakash, L. und Prakash, S. 1993.** Yeast DNA-repair gene *RAD14* encodes a zinc metalloprotein with affinity for ultraviolet-damaged DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5433–5437 ■

- Hamada, J., Kim, S. G. und Matsui, S. 1996.** Morphological and lethal effects of mytomicin-C, MNNG, BaP and 4-NQO on a large unicellular indicator organism, *Chlostridium ehrenbergii* (green alga). *Water Sci. Technol.* **33**: 305–312
- Hamilton, R. W., Buttner, J. K. und Brunetti, R. G. 1975.** Lethal levels of sodium chloride and potassium chloride for an oligochaete, a chironomid midge, and a caddisfly of Lake Michigan. *Environ. Entomol.* **4**: 1003–1006
- Hanahan, D. 1989.** DNA Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd Edition.
- Hanft, V. N., Fruchtman, S. R., Pickens, C. V., Rosse, W. F., Howard, T. A. und Ware, R. E. 2000.** Acquired DNA mutations associated with *in vivo* hydroxyurea exposure. *Blood* **95**: 3589–3593 ■
- Hartwig, A. 2000.** Recent advances in metal carcinogenicity. *Pure Appl. Chem.* **72(6)**: 1007–1014 ■
- Hartwig, A. 1994.** Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ. Health Perspect.* **102(3)**: 45–50
- Hecht, S. S. 1999.** Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**: 1194–1210
- Hecht, S. S. 1997.** Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **216**: 181–191
- Helling, R. B., Goodman, H. H. und Bayer, H. W. 1974.** Analysis of endonuclease R-*EcoRI* fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* **14(5)**: 1235–1244 ■
- Hengen, P. N. 1996.** Carriers for precipitating nucleic acids. *TIBS* **21(6)**: 224–225
- Henschel, K. P., Wenzel, A., Diedrich, M. und Fliedner A. 1997.** Environmental hazard of pharmaceuticals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **25**: 220–225
- Heredia, J., Crooks, M. und Zhu, Z., 2001.** Phosphorylation and Cu⁺ coordination-dependent DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport. *J. Biol. Chem.* **276**: 8793–8797
- Hermesen, W., Sims, I. und Crane, M. 1994.** The bioavailability and toxicity to *Mytilus edulis* L. of 2 organochlorine pesticides adsorbed to suspended solids. *Marine Environ. Res.* **38**: 61–69
- Hinnen, A., Hicks, J. B. und Fink, G. R. 1978.** Transformation of Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75(4)**: 1929–1933
- Hoffman, C. S. und Winston, F. 1987.** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **75(2-3)**: 267–272
- Huang, M., Zhou, Z. und Elledge, S. J. 1998.** The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* **94**: 595–605
- Huggett, R. L., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M., Jr. und Bergmann, H. L., (Eds.) 1992.** Biomarkers: *Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis, Boca Raton, FL.

- Hutchinson, T.C. 1973.** Comparative studies of the toxicity of heavy metals to phytoplankton and their synergistic interactions. *Water Pollut. Res. Can.* **8**: 69–90
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. und White T. J. (Hrsg.) 1989.** PCR Protocols and Applications: A Laboratory Manual. Academic Press, New York.
- Ishihama, Y., Miwa, T. und asakawa, N. 2002.** Drug-plasma protein binding assay by electrokinetic chromatography-frontal analysis. *Electrophoresis* **23**: 951–955 ■
- Jensen, L. T., Ajua-Alemanji, M. und Culotta, V. C. 2003.** The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278(43)**: 42036–42040
- Jones, J. R. E. 1941.** A study of the relative toxicity of anions with *Polycelis nigra* as test animal. *J. Exper. Biol.* **18**: 170–181
- Kaag, N. H. B. M., Foekema, E. M. und Scholten, M. C. T. 1998.** Ecotoxicity of contaminated sediments, a matter of bioavailability. *Wat. Sci. Tech.* **37**: 225–231
- Kada, T., K. Tutikawa, K. und Sadale, Y. 1972.** In vitro and host-mediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens and phloxine, a mutagenic red dye detected. *Mutat. Res.* **16**: 165–174
- Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S. und Coquerelle, T. 1991.** Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* **12(10)**: 1857–1867
- Kasten, U., Mullenders, L. H. und Hartwig, A. 1997.** Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutat. Res.* **383**: 81–89
- Kaufmann, W. K., Heffernan, T. P., Beaulieu, L. M., Doherty, S., Frank, A. R., Zhou, Y., Bryant, M. F., Zhou, T., Luche, D. D., Nikolaishvili-Feinberg, N., Simpson, D. A. und Cordeiro-Stone, M. 2003.** Caffeine and human DNA metabolism: the magic and the mystery. *Mutat. Res.* **532(1-2)**: 85–102
- Kelly, D. und Parry, J. M. 1983.** Metabolic activation of cytochrome P-450/P-448 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **108(1-3)**: 147–159
- Kessler, C. und Manta, V. 1990.** Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases – a review (Edition 3). *Gene* **92**: 1–248
- Khargarot, B.S. 1991.** Toxicity of Metals to a Freshwater Tubificid Worm, *Tubifex tubifex*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **46**: 906–912
- Khargarot, B.S. und Ray, P.K. 1989.** Investigation of correlation between physicochemical properties of metals and their toxicity to the water flea *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol. Envir. Safety* **18**: 109–120
- Khargarot, B.S., Ray, P.K. und Chandra, H. 1987.** *Daphnia magna* as a model to assess heavy metal toxicity: comparative assessment with mouse system. *Acta hydrochim. Hydrobiol.* **15(4)**: 427–432

- Khayat, A. S., Guimarães, A. C., Cardoso, P. C., de Lima, P. D. L., de Oliveira Bahia, M., Antunes, L. M. G. und Burbano, R. R. 2004.** Mutagenicity of hydroxyurea in lymphocytes from patients with sickle cell disease. *Genet. Mol. Biol.* **27**: 115–117
- Kimball, G. 1978.** The effects of lesser known metals and one organic to fathead minnows (*Pimephales promelas*) and *Daphnia magna*. Department of Entomology, Fisheries and Wildlife, University of Minnesota.
- King, E. F. 1984.** A comparative study of methods for assessing the toxicity to bacteria of single chemicals and mixtures. In D. Liu und B. J. Dutka (Hrsg): Toxicity screening procedures using bacterial systems: 175–193. New York, Basel, Marcel Dekker Inc.
- Kirtane, A., Ismail-Beigi, N. und Ismail-Beigi, F. 1994.** Role of enhanced Na⁺ entry in the control of Na,K-ATPase gene expression by serum. *J. Membr. Biol.* **137(1)**: 9–15
- Knippers, R. (Hrsg.) 1997.** Molekulare Genetik – 7. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart & New York. ISBN 3-13-477007-5
- Koch, R., Schlegelmilch, R. und Wolf, H. U. 1988.** Genetic effects of chlorinated ethylenes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **206(2)**: 209–216
- Kohn, K. W. und Grimek-Ewig, R. A. 1973:** Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. *Cancer Res.* **33(8)**:1849–1853
- Koizumi T., Li, Z. G. und Tatsumoto, H. 1992.** DNA damaging activity of cadmium in Leyding cells, a target cell population for cadmium carcinogenesis in the rat testis. *Toxicol. Lett.* **63(2)**: 211–220
- Kolaczowska, A. und Goffeau, A. 1999.** Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist. Updat.* **2**: 403–414
- Kolaczowski, M., Kolaczowska, A., Luczynski, J., Witek, S. und Goffeau, A., 1998.** *In vivo* characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.* **4**: 143–158
- Kolaczowski, M. und Goffeau, A. 1997.** Active efflux by multidrug transporters as one of the strategies to evade chemotherapy and novel practical implications of yeast pleiotropic drug resistance. *Pharmacol. Ther.* **76**: 219–242
- Könemann, H. und Musch, A. 1981.** Quantitative structure-activity relationships in fish toxicity studies. Part 2: The influence of pH on the QSAR of chlorophenols. *Toxicology* **19**: 223–228.
- Kozlova, O., Zwinderman, M. und Christofi, N. 2005.** A new short-term toxicity assay using *Aspergillus awamori* with recombinant aequorin gene. *BMC Microbiol.* **5:40** (<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/40>) ■
- Kuboyama, N. und Fujii, A. 1992.** Mutagenicity of analgesics, their derivatives, and anti-inflammatory drugs with S-9 mix of several animal species. *J. Nihon. Univ. Sch. Dent.* **34(3)**: 183–195
- Kuhn, R., Pattard, M., Pernak, K. und Winter, A. 1989.** Results of the harmful effects of selected water pollutants (anilines, phenols, aliphatic compounds) to *Daphnia magna*. *Water Res.* **23(4)**: 495–499

- Kulich, W. und Klein, G. 1986.** Investigations of the influence of nonsteroidal antirheumatic drugs on the rates of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* **174(2)**: 131–134
- Kültz, D. und Chakravarty, D. 2001.** Hyperosmolarity in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *PNAS* **98(4)**: 1999–2004 ■
- Kuo, M. H. und Grayhack, E. 1994.** A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol. Cell Biol.* **14(1)**: 348–359 ■
- Labbé, S. und Thiele, D. J. 1999.** Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. *Trends Microbiol.* **7(12)**: 500–505
- Langard, S. 1990.** One hundred years of chromium and cancer: a review of epidemiological evidence and selected case reports. *Am. J. Ind. Med.* **17(2)**: 189–215
- Lauermann, V. 1991.** Ethanol improves the transformation efficiency of intact yeast cells. *Curr. Genet.* **20(1-2)**: 1–3
- Lee, S. E., Pelliccioli, A., Demeter, J., Vaze, M. P., Gasch, A. P., Malkova, A., Brown, P. O., Botstein, D., Stearns, T., Foiani, M. und Haber, J. E. 2000.** Arrest, adaptation and recovery following a chromosome double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **65**: 303–314
- Lehmann, A. R. 2003.** DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **85**: 1101–1111
- Lewin, B., (Hrsg.) 1998.** Molekularbiologie der Gene. Sechste Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg · Berlin. ISBN 3-8274-0234-4
- Li, L. und Kaplan, J. 1998.** Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J. Biol. Chem.* **273**: 22181–22187
- Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M., Thiele, D. J. und Rea, P. A. 1997.** A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato) cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 42–47
- Lilius, H., Hastbacka, T. und Isomaa, B. 1995.** A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Environ. Toxicol. Chem.* **14(12)**: 2085–2088
- Lilius, H., Isomaa, B. und Holmstrom, T. 1994.** A comparison of the toxicity of 50 reference chemicals to freshly isolated rainbow-trout hepatocytes and *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol.* **30(1)**: 47–60
- Lison, D., de Boeck, M., Verougstraete, V. und Kirsch-Volders, M. 2001.** Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup. Environ. Med.* **58**: 619–625 ■
- Liu, D., Thomson, K. und Kaiser, K. L. 1982.** Quantitative structure-toxicity relationship of halogenated phenols on bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **29(2)**: 130–136
- Liu, K. J. und Shi, X. 2001.** *In vivo* reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol. Cell. Biochem.* **222**: 41–47

- Loizou, J. I., Murr, R., Finkbeiner, M. G., Sawan, C., Wang, Z. Q. und Herceg, Z. 2006.** Epigenetic information in chromatin: the code of entry for DNA repair. *Cell Cycle* **5(7)**: 696–701
- Longhese, M. P., Foiani, M., Muzi-Falconi, M., Lucchini, G. und Plevani, P. 1998.** DNA damage checkpoint in budding yeast. *EMBO J.* **17(19)**: 5525–5528 ■
- Luza, S. C. und Speisky, H. C. 1996.** Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**: 812S–820S
- Lyn Patrick, N. D. 2003.** Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Altern. Med. Rev.* **8(2)**: 106–128 ■
- Lyons, T. J., Gasch, A. P., Gaither, L. A., Botstein, D., Brown, P. O., Eide, D. J. 2000.** Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7957–7962
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A., Eide, D. J. 2000.** Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**: 2845–2855 ■
- MacPhail, R. C. 1999.** Recent developments in neurotoxicology. *Inhal. Toxicol.* **11(6-7)**: 519–521
- Macek, K. J., Buxton, K. S., Derr, S. K., Dean, J. W. und Sauter, S., 1976.** Chronic toxicity of lindane to selected aquatic invertebrates and fishes. *U. S. Environmental Protection Agency Ecological Research Series*. EPA-600/3-76-047, Washington DC.
- Mao, Y., Liu, K. J., Jiang, J. J. und Shi, X. 1996.** Generation of reactive oxygen species by Co(II) from H₂O₂ in the presence of chelators in relation to DNA damage and 2'-deoxyguanosine hydroxylation. *J. Toxicol. Environ. Health* **47(1)**: 61–75
- Marr, J. C. A., Hansen, J. A., Meyer, J. S., Cacela, D., Podrabsky, T., Lipton, J. und Bergman, H.L. 1998.** Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival. *Aquatic Toxicol.* **43**: 225–238
- Martin, T. R. und Holdich, D. M. 1986.** The acute lethal toxicity of heavy metals to peracarid crustaceans (with particular reference to fresh-water asellids and gammarids). *Water Res.* **20(9)**: 1137–1147
- Marzullo, L. 2005.** An update of N-acetylcysteine treatment for acute acetaminophen toxicity in children. *Curr. Opin. Pediatr.* **17**: 239–245 ■
- Mateus, C. und Avery, S. V. 2000.** Destabilized green fluorescent protein for monitoring dynamic changes in yeast gene expression with flow cytometry. *Yeast* **16**: 1313–1323 ■
- Matile, P. 1969.** Prospects of yeast cytology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **35**: 59–70
- Maund, S. J., Peither, H., Taylor, E. J., Jüttner, I., Beyer-Le-Pfnür, R., Lay, J. P. und Pascoe, D. 1992.** Toxicity of lindane to freshwater insect larvae in compartments of an experimental pond. *Ecotoxicol. Env. Safety* **23**: 76–88
- McCarthy, J. F. und Shugart, L. R. (Hrsg.) 1990.** *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis, Boca Raton, FL.

- McDonald, D. G., Reader, J. P. und Dalziel, T. R. K. 1989.** The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. In R. Morris, E. W. Taylor, D. J. A. Brown und J. A. Brown (Hrsg.): *Acid Toxicity and Aquatic Animals*. Soc. For Exp. Biol, Seminar Series **34**: 221-242. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Mell, J. C. und Burgess, S. M. 2002.** Yeast as a Model Genetic Organism. *Encyclopedia Of Life Sciences*. 1–8 ■
- Merrit, K., Brown, S. A. und Sharkey, N. A. 1984.** The binding of metal salts and corrosion products to cells and proteins *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res.* **18**: 1005–1015
- Migliore, L., Rossi, A. M. und Loprieno, N. 1982.** Mutagenic action of structurally related alkene oxides on *Schizosaccharomyces pombe*: the influence, “in vitro”, of mouse-liver metabolizing system. *Mutat. Res.* **102(4)**: 425–437
- Misra, R. R., Smith, G. T. und Waalkes, M. P. 1998.** Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines. *Toxicology* **126(2)**: 103–114
- Misteli, T. und Spector, D. L. 1997.** Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat. Biotechnol.* **15(10)**: 961–964
- Monteiro, G., Supply, P., Goffeau, A. und Sá-Correia, I. 1994.** The *in vivo* activation of *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H⁺-ATPase by ethanol depends on the expression of the *PMA1* gene, but not of the *PMA2* gene. *Yeast* **10**: 1439–1446
- Mouron, S. A., Grillo, C. A., Dulout, F. N. und Golijow, C. D. 2004.** A comparative investigation of DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and K-ras gene mutations induced by cadmium salts in cultured human cells. *Mutat. Res.* **568(2)**: 221–231
- Müller, D., Natarajan, A. T., Obe, G. und Röhrborn, G. (Hrsg.) 1982.** Sister-Chromatid-Exchange-Test. Georg Thieme Verlag, Stuttgart & New York.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. 1987.** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335–350
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. T. und Erlich, H. A. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263
- Murguía, J. R., Bellés, J. M. und Serrano, R. 1996.** The yeast *HAL2* nucleotidase is an *in vivo* target of salt toxicity. *J. Biol. Chem.* **271(46)**: 29029–29033 ■
- Nathans, D. und Smith, H. O. 1975.** Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.* **44**: 273–293
- Naudin, S., Garric, J., Vindimian, E., Bray, M., Migeon, B., Vollat, B. und Lenon, G. 1995.** Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **30**: 54-62
- Navaratnam, S., Myles, G. M., Strange, R. W. und Sancar, A. 1989.** Evidence from extended X-ray absorption fine structure and site-specific mutagenesis for zinc fingers in UvrA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264(27)**: 16067–16071 ■
- NELAC. 2001.** National laboratory accreditation conference: Constitution, Bylaws and Standards. May, 2001. USEPA, Office of Research and Development.

- Newman, M. C. und Aplin, M. 1992.** Enhancing toxicity data interpretation and prediction of ecological risk with survival time modeling: An illustration using sodium chloride toxicity to mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Aquatic Toxicol.* **23**: 85–96
- Oda, Y., Nakamura, S. I., Oki, I., Kato, T. und Shinagawa, H. 1985.** Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* **147**: 219–229
- Östling, O. und Johanson, K. J. 1984.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**: 291–298
- Otha, T., Nakumara, N., Moriya, M., Shirasu, T. und Kada, T. 1984.** The SOS-function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **131**: 101–109
- Painter, R. B. und Young, B. R. 1980.** Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **77(12)**: 7315–7317 ■
- Paran, J. H., Sharma, S. und Quershi, A. A. 1990.** A rapid and simple toxicity assay based on growth rate inhibition of *Pseudomonas fluorescens*. *Toxic. Assess.* **5**: 351–365
- Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M. und Williams, D. P. 2005.** The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 177–202 ■
- Parker, K. R. und Borstel, R. C. 1990.** Antimutagenesis in yeast by sodium chloride, potassium chloride, and sodium saccharin. *Basic Life Sci.* **52**: 367–371
- Patrick, R., Cairns, J. Jr. und Scheier, A. 1968.** The relative sensitivity of diatoms, snails, and fish to twenty common constituents of industrial wastes. *Prog. Fish. Cult.* **30(3)**: 137–140
- Paulovich, A. G. und Hartwell, L. H. 1995.** A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* **82**: 841–847
- Pazin, M. J. und Kadonaga, J. T. 1997.** Swi2/Snf2 and related proteins: ATP driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell* **88**: 737–740
- Petukhova, G., Stratton, S. und Sung, P. 1998.** Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature* **393**: 91–94 ■
- Poirier, M. C. und Weston, A. 2002.** DNA Damage, DNA repair and mutagenesis. In J. Bertino (Hrsg.): *Encyclopedia of cancer*. **2**: 641–649. Elsevier Science, San Diego.
- Pool-Zobel, B. L., Guigas, C., Klein, R., Neudecker, C., Renner, H. W. und Schmezer, P. 1993.** Assessment of genotoxic effects by lindane. *Food. Chem. Toxicol.* **31(4)**: 271–283
- Poulsen, H. E., Prieme, H. und Loft, S. 1998.** Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur. J. Cancer Prev.* **7**: 9–16
- Pourahmad, J., O'Brien, P. J. 2000.** A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology* **143**: 262–273
- Premkumar, J. R., Rosen, R., Belkin, S. und Lev, O. 2002a.** Sol-gel luminescence biosensors: Encapsulation of recombinant *E. coli* reporters in thick silicate films. *Anal. Chim. Acta* **462**: 11–23 ■

- Premkumar, J. R., Sagi, E., Rosen, R., Belkin, S., Modestov, A. D. und Lev, O. 2002b.** Fluorescent bacteria encapsulated in sol-gel derived silicate films. *Chem. Mater.* **14**: 2676–2686 ■
- Premkumar, J. R., Lev, O., Rosen, R. und Belkin, S. 2001.** Encapsulation of luminous recombinant *E. coli* in sol-gel silicate films. *Adv. Mater.* **13(23)**: 1773–1775 ■
- Quillardet, P. und Hofnung, M. 1985.** The SOS Chromotest, a calorimetric assay for genotoxins: Procedures. *Mutat. Res.* **147**: 65–78
- Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R. und Hofnung, M. 1982.** SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5971–5975 ■
- Rachlin, J. W. und Grosso, A. 1993.** The growth response of the green alga *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **24**: 16–20
- Ramotar, D., Belanger, E., Brodeur, I., Masson, J.-Y. und Drobetsky, E. A. 1998.** A yeast homologue of the human phosphotyrosol phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative damage induced by the model carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *J. Biol. Chem.* **273(34)**: 21489–21496 ■
- Rao, R. und Slayman, C. W. 1996.** Plasma membrane and related ATPases. In R. Brambl und G. Marzluf: *The Mycota* **3**: 29–56. Springer Verlag, Berlin.
- Rasio, D., Murakumo, Y., Robbins, D., Roth, T., Silver, A., Negrini, M., Schmidt, C., Burczak, J., Fishel, R. und Croce C. M. 1997.** Characterization of the human homologue of *RAD54*: a gene located on chromosome 1p32 at a region of high loss of heterozygosity in breast tumors. *Cancer Res.* **57(12)**: 2378–2383
- Ratra, G.S., Kamita, S. G. und Casida, J. E. 2001.** Role of human GABA(A) receptor beta3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**: 233–240
- Raucy, J. L., Lasker, J. M., Lieber, C. S. und Black, M. 1989.** Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450-IIE1 and P450IA2. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**: 270–283
- Reddy, J. K. und Lalwani, N. D. 1983.** Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *Crit. Rev. Toxicol.* **12**: 1–58
- Reed, R. B. und Davies, W. D. 1981.** Estimating rate of exploitation from tag returns and fishing effort. Proceedings of the annual conference of the south eastern association of fish and wildlife agencies. **34**: 151–157
- Reifferscheid, G., Heil, J., Oda, Y. und Zahn, R. K. 1991.** A microplate version of the SOS/*umu*-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutat. Res.* **253**: 215–222
- Reinke, M., Kalnowski, G. und Dott, W. 1995.** Evaluation of an automated, minituarized *Pseudomonas putida* growth inhibition assay. *Vom Wasser* **85**: 199–213
- Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J. P., Bailly, B. und Rahmani, R. 2001.** Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. *Aquat. Toxicol.* **53(1)**: 65–76

- Robins, R., Jones, C. J., Biggerstaff, M., Tomas Lindahl, T. und Wood, R. D. 1991.** Complementation of DNA repair in xeroderma pigmentosum group A cell extracts by a protein with affinity for damaged DNA. *EMBO J.* **10(12)**: 3913–3921 ■
- Rossi, R., Montecucco, A., Ciarrocchi, G. und Biamonti, G. 1997.** Functional characterization of the T4 DNA Ligase: a new insight into the mechanism of action. *Nucleic Acids Res.* **25(11)**: 2106–2113 ■
- Russom, C. L., Bradbury S. P., Broderius S. J., Hammermeister, D. E. und Drummond, R. A. 1997.** Predicting modes of toxic action from chemical structure: Acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* **16(5)**: 948–967
- Sachs, L. (Hrsg.) 2004.** Lothar Sachs: Angewandte Statistik. 11. Auflage. Springer Verlag
- Sagripanti, J. L., Goering, P. L. und Lamanna, A. 1991.** Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **110**: 477–485
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350–1354
- Salama, S. R., Hendricks, K. B. und Thorner J. 1994.** G1 cyclin degradation: the PEST motif of yeast Cln2 is necessary, but not sufficient, for rapid protein turnover. *Mol. Cell. Biol.* **14(12)**: 7953–7966 ■
- Salsbury, F. R., Clodfelter, J. E., Gentry, M. B., Hollis, T. und Drotschmann-Scarpinato, K. 2006.** The molecular mechanism of DNA damage recognition by MutS homologs and its consequences for cell death response. *Nucleic Acids Res.* **34(8)**: 2173–2185 ■
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., (Eds.) 1989.** A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. 1977.** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74(12)**: 5463–5467 ■
- Sarkar, B. 1995.** Metal replacement in DNA-binding zinc finger proteins and its relevance to mutagenicity and carcinogenicity through free radical generation. *Nutrition* **11**: 646–649
- Sauvant, M. P., Pepin, D., Bohatier, J. und Groliere, C. A. 1995.** Microplate technique for screening and assessing cytotoxicity of xenobiotics with *Tetrahymena pyriformis*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **32**: 159–165
- Schlegel, H. G. 1992.** Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag, 7. Auflage
- Schmitz, R. P. H., Eisenträger, A. und Dott, W. 1998.** Miniaturized kinetic growth inhibition assays with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida* (application, validation and comparison). *J. Microbiol. Meth.* **31**: 159–166
- Schmitt, M., Schwanewilm, P., Ludwig, J. und Lichtenberg-Fraté, H. 2006.** Use of PMA1 as a housekeeping biomarker for assessment of toxicant-induced stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72(2)**: 1515–1522 ■

- Schmitt, M., Gellert, G. und Lichtenberg-Fraté, H. 2005b.** The toxic potential of an industrial effluent determined with the *Saccharomyces cerevisiae*-based assay. *Water Res.* **39(14)**: 3211–3218 ■
- Schmitt, M., Gellert, G., Ludwig, J. und Lichtenberg-Fraté, H. 2005a.** Assessment of cyto- and genotoxic effects of a variety of chemicals using *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **33(1)**: 56–63 ■
- Schmitt, M., Gellert, G., Ludwig, J. und Lichtenberg-Fraté, H. 2004.** Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **59**: 142–150 ■
- Schuytema, G. S., Nebeker, A. V., Griffis, W. L. und Miller, C. E. 1989.** Effects of freezing on toxicity of sediments contaminated with DDT and endrin. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: 150–155
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. und Negele, R. D. 2004.** Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* **68(2)**: 151–150
- Sen, P., Conway, K. und Costa M. 1987.** Comparison of the localization of chromosome damage induced by calcium chromate and nickel compounds. *Cancer Res.* **47(8)**: 2142–2147
- Sengstag, C., Eugster, H.-P. und Wurgler, F. E. 1994.** High promutagen activating capacity of yeast microsomes containing human cytochrome P-450 1A and human NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Carcinogenesis* **15**: 837–843
- Serrano, R. 1991.** Transport across yeast vacuolar and plasma membrane. In E. W. Jones und J. R. Broach (Hrsg.): *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: genome dynamics, protein synthesis, and energetics*: 523–585. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Serrano, R. 1988.** Structure and function of the proton translocating ATPase in plasma membrane of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 1–28
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. und Fink, G. R. 1986.** Yeast plasma membrane H⁺-ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺-K⁺)-, K⁺- und Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**: 689–693
- Shao, C. Y., Howe, C. J., Porter, A. J. R. und Glover, L. A. 2002.** Novel cyanobacterial biosensor for detection of herbicides. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(10)**: 5026–5033
- Sharma, R. M., Panigrahi, S. und Azeez, P.A. 1987.** Effect of cobalt on the primary productivity of *Spirulina platensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **39**: 716–720
- Sharp, P. A., Sudgen, B. und Sambrook, J. 1973.** Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochem.* **12(16)**: 3055–3063
- Shih, C. M., Wu, J. S., Ko, W. C., Wang, L. F., Wie, Y. H., Liang, H. F., Chen, Y. C. und Chen, C. T. 2003.** Mitochondria-mediated caspase-independent apoptosis induced by cadmium in normal human lung cells. *J. Cell. Biochem.* **89**: 335–347
- Shiraishi, E., Inouhe, M., Joho, M. und Tohyama, H. 2000.** The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* **37**: 79–86

- Slabbert, J. L. 1986.** Improved bacterial growth test for rapid water toxicity screening. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **37**: 565–569
- Smith, G. J., Grisham, J. W. 1983.** Cytotoxicity of monofunctional alkylating agents. Methyl methanesulfonate and methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine have different mechanisms of toxicity for 10T1/2 cells. *Mutat. Res.* **111(3)**: 405–417
- Solski, A. und Piontek, M. 1987.** The use of planarian *Dugesia tigrina* Girard for the assessment of chronic intoxications. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **34**: 543–550
- Southern, E. M. 1979.** Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* **68**: 152–176
- Spehar, R. L. und Lemke, A. E. 1981.** Effects of pollution on freshwater fish. *J. Water Poll. Contr. Fed.* **53(6)**: 1028–1076
- Srikanth, C. V., Chakraborti, A. K. und Bachhawat, A. K. 2005.** Acetaminophen toxicity and resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **151(1)**: 99–111
- Srivastava, A. K. und Agrawal, S. J. 1979.** Haematological anomalies in a freshwater teleost, *Colisa fasciatus*, on acute exposure to cobalt. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **44**: 197–199
- Stearns, D. M., Kennedy, L. J., Courtney, K. D., Giangrande, P. H., Phieffer, L. S. und Wetterhahn, K. E. 1995.** Reduction of chromium(VI) by ascorbate leads to chromium-DNA binding and DNA strand breaks *in vitro*. *Biochem.* **34(3)**: 910–919
- Stearns, D. M. und Wetterhahn, K. E. 1994.** Reaction of chromium(VI) with ascorbate produces chromium(V), chromium(IV), and carbon-based radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **7(2)**: 219–230
- Stohs, S. J. und Bagchi, D. 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 321–336
- Stubbe, J. und van der Donk, W. A. 1995.** Ribonucleotide reductases: radical enzymes with suicidal tendencies. *Chem. Biol.* **2**: 793–801
- Stubbe, J. 1990.** Ribonucleoside reductases: amazing and confusing. *J. Biol. Chem.* **265(10)**: 5329–5332 ■
- Sudgen, K. D. und Stearns, D. M. 2000.** The role of chromium(VI) in the mechanism of chromate-induced oxidative DNA damage and cancer. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19**: 215–230
- Sugiyama M., Wang, X. W. und Costa M. 1986.** Comparison of DNA lesions and cytotoxicity induced by calcium chromate in human, mouse, and hamster cell lines. *Cancer Res.* **46(9)**: 4547–4551
- Sunderman, F.W. 1992.** Embryotoxicity and teratogenicity of Ni²⁺ and Co²⁺ in *Xenopus laevis*. In E. Merlan und W. Haerdi (Hrsg): *Metal Compounds in Environment and Life*. Kapitel 4: Interrelationship Between Chemistry and Biology. Science and Technol. Letters, Northwood, Middlesex (UK), 467–474
- Tafazoli, S., Spehar, D. D. und O'Brien, P. J. 1999.** Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity. *Drug. Metab. Rev.* **37(2)**: 311–25

- Tanaka, H. und Mizojiri, K. 1999.** Drug-protein binding and blood-brain barrier permeability. *JPET* **288**: 912–918 ■
- Tanaka, K., Miura, N., Satokata, I., Miyamoto, I., Yoshida, M. C., Satoh, Y., Kondo, S., Yasui, A., Okayama, H. und Okada Y. 1990.** Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature* **348(6296)**: 73–76
- Tang, W., Stearns R. A., Bandiera S. M., Zhang, Y., Raab, C., Braun, M. P., Dean, D. C., Pang, J., Leung, K. H., Doss, G. A., Strauss, J. R., Kwei, G. Y., Rushmore, T. H., Chiu, S.-H. L. und Baillie, T. A. 1999.** Studies on cytochrome-P450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and human hepatocytes: Identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **27**: 365–372
- Thompson, D. und Easton, D. 2002.** Cancer incidence: BRCA1 mutations. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**:1358–1365 ■
- Thornton, K. W. und Sauer, J. R. 1972.** Physiological effects of NaCl on *Chironomus attenuatus* (Diptera: Chironomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **65**: 872–875
- Threader, R. W. und Houston, A. H. 1983.** Use of NaCl as a reference toxicant for goldfish, *Carassius auratus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40(1)**: 89–92
- Thummel, K. E., Lee, C. A., Kunze, K. L., Nelson, S. D. und Slattery, J. T. 1993.** Oxidation of acetaminophen to N-acetyl-p-aminobenzoquinone imine by human CYP3A4. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1563–69
- Tohoyama, H., Kadota, H., Shiraishi, E., Inouhe, M. und Joho, M., 2001.** Induction for the expression of yeast metallothionein gene, CUP1, by cobalt. *Microbios* **104**: 99–104
- Torslov, J. 1993.** Comparison of bacterial toxicity tests based on growth, dehydrogenase activity and esterase activity of *Pseudomonas fluorescens*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **25**: 33–40
- Ulaszewski, S., van Herck, J. C., Dufour, J. P., Kulpa, J., Nieuwenhuis, B. und Goffeau, A. 1987.** A single mutation confers vanadate resistance to the plasma membrane H⁺-ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **262**: 223–228 ■
- Valverde, M., Trejo, C. und Rojas, E. 2001.** Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis* **16(3)**: 265–270
- Van Boekel, M. A., van den Bergh, P. J. und Hoenders, H. J. 1992.** Glycation of human serum albumin: inhibition by diclofenac. *Biochim. Biophys. Acta* **1120(2)**: 201–204
- Van Staveren, W. C. G., Markerink-van Ittersum, M., Steinbusch, H. W. M. und de Vente, J. 2001.** The effects of phosphodiesterase inhibition on cyclic GMP and cyclic AMP accumulation in the hippocampus of the rat. *Brain Res.* **888**: 275–86
- Venkitaraman, A. R. 2002.** Cancer susceptibility and the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Cell* **108**:171–182
- Viegas, C. A. und Sá-Correia, I. 1995.** Toxicity of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* at temperatures between 8.5 and 30 °C. *Enzyme Microbiol. Technol.* **17**: 826–831

- Viegas, C. A., Supply P., Capieaux E., van Dyck, L., Goffeau, A. und Sá-Correia, I. 1994.** Regulation of the expression of the H⁺-ATPase genes *PMA1* and *PMA2* during growth and effects of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1217**: 74–80
- Voitkun, V., Zhitkovich, A. und Costa, M. 1998.** Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nuc. Acids Res.* **26(8)**: 2024–2030 ■
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. und Beyersmann, D. 2003.** Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192(2-3)**: 95–117
- Wallen, I. E., Greer, W. C. und Lasater, R. 1957.** Toxicity of *Gambusia affinis* of certain pure chemicals in turbid waters. *Sewage and Industrial Wastes* **29**: 695–711
- Walmsley, R. M., Billinton, N. und Heyer, W.-D. 1997.** Green fluorescent protein as a reporter for the DNA damage-induced gene *RAD54* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1535–1545
- Waring, J. F., Ciurlionis, R., Jolly, R. A., Heindel, M. und Ulrich, R. G. 2003.** Microarray analysis of hepatotoxins *in vitro* reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. *Toxicol. Lett.* **120**:359–368
- Warnick, S.L. und Bell, H.L. 1969.** The acute toxicity of some heavy metals to different species of aquatic insects. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* **41**: 281–284
- Weber, J., Plantikow, A. und Kreutzmann, J. 2000.** A new bioassay with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on aquatic pollution. *Umweltwiss. Schadstoff-Forsch.* **12**: 185–189
- Weinert, T. 1998.** DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 185–193
- Weinert, T. und Hartwell, L. 1989.** Control of G2 delay by the *RAD9* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci. Suppl.* **12**: 145–148
- Weinert, T. und Hartwell, L. 1988.** The *RAD9* gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241(4863)**: 317–322
- White, P. A., Rasmussen, J. B. und Blaise, C. 1996.** Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. *Environ. Mol. Mutagen.* **27(2)**: 116–139
- White, T. J., Arnheim, N., Erlich, H. A. 1989.** The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* **5(6)**: 185–189
- Witters, H. E. 1998.** Chemical speciation dynamics and toxicity assessment in aquatic systems. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **41**: 90–95
- Yang, W. 2006.** Poor base stacking at DNA lesions may initiate recognition by many repair proteins. *DNA Repair* **5(6)**: 654–666
- Yang, J., Xu, Z.-P., Huang, Y., Hamrick, H. E., Duerksen-Hughes, P. J. und Yu, Y.-N. 2004.** ATM and ATR: Sensing DNA damage. *World J. Gastroenterol.* **10(2)**:155–160
- Yarbro, J. W. 1992.** Mechanisms of action of hydroxyurea. *Semin. Oncol.* **19**: 1–10

Yu, Z., Chen, J., Ford, B. N., Brackley, M. E. und Glickman, B. W. 1999. Human DNA repair systems: an overview. *Environ. Mol. Mutagen.* **33**: 3–20

Zhang, Z., Dmitrieva, N. I., Park, J.-H., Levine, R. L. und Murg M. B. 2004. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and *in vivo*, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *PNAS* **101(25)**: 9491–9496 ■

Zhitkovich, A., Shrager, S. und Messer, J. 2000. Reductive metabolism of Cr(VI) by cysteine leads to the formation of binary and ternary Cr--DNA adducts in the absence of oxidative DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* **13(11)**: 1114–1124

Zhao, H. und Eide, D. 1996a. The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2454–2458 ■

Zhao, H. und Eide, D. 1996b. The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271(38)**: 23203–23210 ■

Zhao, Y., Hopkins, K. M. und Liebermann, H. B. 1993. A method for the preparation and storage of frozen, competent *Schizosaccharomyces pombe* spheroblasts. *Bio Techniques* **15**: 23

Zhou, B. S. und Elledge, S. J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433–439 ■

Normative Verweisungen

DIN 38412-33 Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (*Scenedesmus*-Chlorophyll-Fluoreszenztest über Verdünnungsstufen). DEV-25. Lieferung 1991

DIN 38412-37 Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien (Photobakterium-phosphoreum-Zellvermehrungs-Hemmtest). DEV-45. Lieferung 1999.

DIN 38415-3 Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) – Teil 3: Bestimmung des erbgut-verändernden Potenzials von Wasser mit dem *umu*-Test (T3)

DIN EN ISO 7027 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Trübung.

DIN EN ISO 11348-1: 1999-04 Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest).

■ Artikel ist der beiliegenden CD als PDF-Datei beigelegt